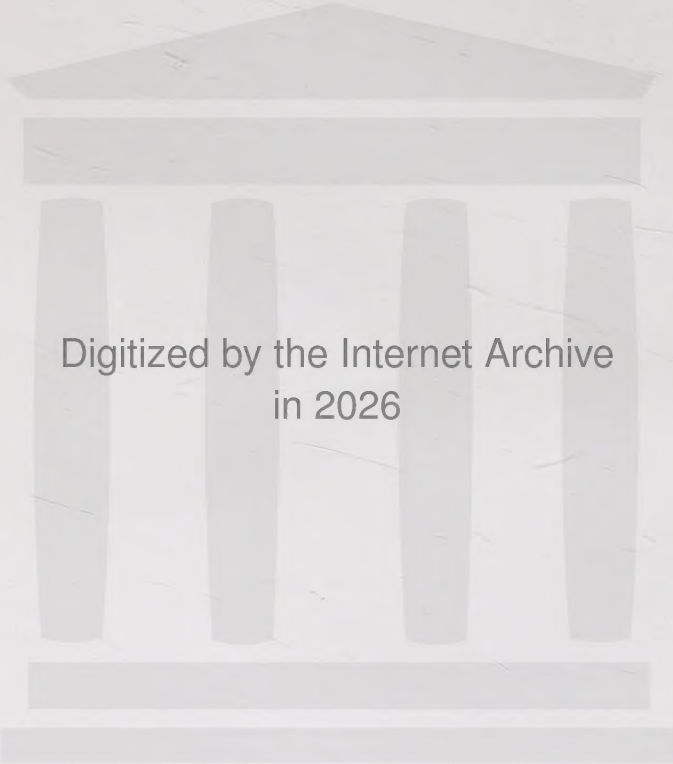


DIE PRIMÄRSTRUKTUR DER HÄMOGLOBINE
DES ADULTEN ANDENKONDORS
(VULTUR GRYPHUS)

Neue Aspekte zur Verwandtschaft der Cathartiformes
(Neuweltgeier) mit Accipitriformes (Greifvögel)
und Ciconiiformes (Störche)

HANS BAUER

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Direktor: Prof. Dr. G. Braunitzer

und dem
Institut für Geflügelkrankheiten
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. J. Kösters

Die Primärstruktur der Hämoglobine
des adulten Andenkondors (*Vultur gryphus*)
Neue Aspekte zur Verwandtschaft der Cathartiformes
(Neuweltgeier) mit Accipitriformes (Greifvögel)
und Ciconiiformes (Störche).

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Hans Bauer
aus
Gerabronn

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Prof. Dr. J. Boessneck

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

1. Name des Antragstellers
2. Geburtsdatum
3. Geburtsort
4. Matrikelnummer
5. Fachrichtung
6. Semester
7. Name des Betreuers
8. Name des Betreuers
9. Name des Betreuers
10. Name des Betreuers
11. Name des Betreuers
12. Name des Betreuers
13. Name des Betreuers
14. Name des Betreuers
15. Name des Betreuers
16. Name des Betreuers
17. Name des Betreuers
18. Name des Betreuers
19. Name des Betreuers
20. Name des Betreuers
21. Name des Betreuers
22. Name des Betreuers
23. Name des Betreuers
24. Name des Betreuers
25. Name des Betreuers
26. Name des Betreuers
27. Name des Betreuers
28. Name des Betreuers
29. Name des Betreuers
30. Name des Betreuers
31. Name des Betreuers
32. Name des Betreuers
33. Name des Betreuers
34. Name des Betreuers
35. Name des Betreuers
36. Name des Betreuers
37. Name des Betreuers
38. Name des Betreuers
39. Name des Betreuers
40. Name des Betreuers
41. Name des Betreuers
42. Name des Betreuers
43. Name des Betreuers
44. Name des Betreuers
45. Name des Betreuers
46. Name des Betreuers
47. Name des Betreuers
48. Name des Betreuers
49. Name des Betreuers
50. Name des Betreuers
51. Name des Betreuers
52. Name des Betreuers
53. Name des Betreuers
54. Name des Betreuers
55. Name des Betreuers
56. Name des Betreuers
57. Name des Betreuers
58. Name des Betreuers
59. Name des Betreuers
60. Name des Betreuers
61. Name des Betreuers
62. Name des Betreuers
63. Name des Betreuers
64. Name des Betreuers
65. Name des Betreuers
66. Name des Betreuers
67. Name des Betreuers
68. Name des Betreuers
69. Name des Betreuers
70. Name des Betreuers
71. Name des Betreuers
72. Name des Betreuers
73. Name des Betreuers
74. Name des Betreuers
75. Name des Betreuers
76. Name des Betreuers
77. Name des Betreuers
78. Name des Betreuers
79. Name des Betreuers
80. Name des Betreuers
81. Name des Betreuers
82. Name des Betreuers
83. Name des Betreuers
84. Name des Betreuers
85. Name des Betreuers
86. Name des Betreuers
87. Name des Betreuers
88. Name des Betreuers
89. Name des Betreuers
90. Name des Betreuers
91. Name des Betreuers
92. Name des Betreuers
93. Name des Betreuers
94. Name des Betreuers
95. Name des Betreuers
96. Name des Betreuers
97. Name des Betreuers
98. Name des Betreuers
99. Name des Betreuers
100. Name des Betreuers

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Schrifttum	2
1. Der geschichtliche Hintergrund des Hämoglobins	2
2. Hämoglobinaufbau	3
2.1 Allgemein	3
2.2 Häm	3
2.3 Polypeptidketten	4
3. Die Funktion des Hämoglobins	5
3.1 Allgemein	5
3.2 Allosterie	6
3.2.1 Der Bohreffekt	7
3.2.2 Polyphosphate und Ionen	7
4. Homologie	9
4.1 Homologie verschiedener Globinketten einer Spezies	9
4.2 Homologie zwischen Tierspezies und Evolution	11
5. Genetik	14
5.1 Speicherung des Genetischen Codes in der DNA	14
5.2 Globingencluster auf Chromosomen	15
5.3 Der Aufbau eines Gens im Gencluster	16
6. Aufklärung der Primärstruktur	18
6.1 N-terminale Sequenzanalyse nach Edman	18
6.1.1 Der Reaktionsmechanismus	19
6.2 Automatische Sequenzanalyse	20
6.2.1 Flüssigphasen-Sequenator (Liquid phase)	20
6.2.2 Gasphasen-Sequenator (Gas phase)	20
6.2.3 Festphasen-Sequenator (Solid phase)	20
6.3 PTH-Identifizierung	21
6.4 Spaltung der Proteinketten in kleinere Bruchstücke	22
6.4.1 Enzymatische Spaltungen	22
6.4.2 Chemische Spaltungen	23
6.5 Peptidtrennung	23

6.5.1	Ionenaustauscherchromatographie	23
6.5.2	Gelchromatographie	23
6.5.3	HPLC über Umkehrphase (reversed phase)	23
6.5.4	Dünnschichtelektrophorese	24
III. Material und Methoden		25
1.	Gewinnung von Globin	25
1.1	Blutentnahme	25
1.2	Herstellung der Erythrozytensuspension	25
1.3	Hämolyse	25
1.4	Titerbestimmung	26
1.5	Hämabspaltung	27
2.	Komponententrennung	27
2.1	Analytisch mit Diskelektrophorese	27
3.	Kettentrennung	28
3.1	Analytisch mit Tritongelelektrophorese	28
3.2	Präparativ mit CM-Cellulose	29
4.	Proteinmodifizierung	30
4.1	Oxidation mit Perameisensäure	30
5.	Proteinspaltungen	31
5.1	Enzymatisch mit TPCK-Trypsin	31
5.2	Hydrolytische Spaltung der Asp/Pro-Bindung	31
6.	Peptidtrennung	32
6.1	Gelchromatographie	32
6.2	RP-HPLC	33
6.3	Dünnschichtelektrophorese	34
7.	Aminosäureanalyse	35
8.	N-Terminaler Aminosäureabbau	36
8.1	Automatische Sequenzanalyse	36
8.2	PTH-Identifizierung	36
8.2.1	Dünnschichtchromatographie	36
8.2.2	HPLC über Umkehrphase	37

IV. Ergebnisse

39

1.	Das Hämoglobin des Andenkondors	39
1.1	Blutentnahme und Globingewinnung	39
1.2	Analytische Trennung der Komponenten	39
1.3	Kettentrennungen	39
1.3.1	Analytisch mit Tritongelegelektrophorese	39
1.3.2	Präparativ durch CM-Cellulose	41
1.4	Die Peptide der α^A -Ketten	44
1.4.1	Aminosäureanalyse und Sequenzanalyse	46
1.5	Die Peptide der α^D -Ketten	47
1.6	Die Peptide der beta-Ketten	53
1.6.1	Hydrolytische Spaltung der Asp/Pro-Bindung und Peptidisolierung	57
1.6.2	Gelchromatographie	58
2.	Hämoglobine verschiedener Hühner	65
2.1	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	65
2.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit Triton	66
2.3	Präparative Kettentrennung	67
2.4	Tryptische Peptide der α^D -Ketten	67

V. Diskussion

71

1.	Das Hämoglobin des Andenkondors	71
2.	Primärstruktur-Funktion-Beziehung	72
2.0.1	Alpha-Ketten aller bekannten Hämoglobine	74
2.0.2	Beta-Ketten aller bekannten Hämoglobine	74
2.1	Vergleich der Ketten der (adulten) Vogelhämoglobine	75
2.1.1	Alpha-Ketten aller bekannten Hämoglobine der Vögel	75
2.1.2	Beta-Ketten aller bekannten Hämoglobine der Vögel	75
2.2	Austausch funktioneller Seitenketten	76
2.2.1	Allosterische Kontrolle durch organische Phosphate	76
2.2.2	Hämbindungsstellen	78
2.2.3	$\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen	79
2.2.4	$\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen	80

3. Evolution	86
3.1 Geschichtlicher Abriß der Einordnung von Cathartiformes in die Systematik	86
3.2 Verschiedene Mutationsgeschwindigkeit der Ketten der Vogelhämoglobine	88
3.3 Homologer Vergleich der alpha ^A -Ketten der Vögel	90
3.4 Homologer Vergleich der alpha ^D -Ketten der Vögel	92
3.5 Homologer Vergleich der beta-Ketten der Vögel	93
4. Die Hühnerhämoglobine	98
VI. Zusammenfassung	100
VII. Summary	102
VIII. Resumen	104
IX. Literatur	106

Abkürzungen

AMP = Adenosinmonophosphat

As. = Aminosäure

ATA-Box = Anheftungscode für RNA-Polymerasen

ATP = Adenosintriphosphat

CM- = Carboxymethyl-

"Core" = Bezeichnung der unlöslichen Fraktion
aus der tryptischen Spaltung

CAT-Box = Erkennungscode für RNA-Polymerasen

DC- = Dünnschicht-

DPG = 2,3-Diphosphoglycerat

Exon = exprimierter Teil der DNA

GTP = Guanosintriphosphat

HAC = konzentrierte Essigsäure

Hb = Hämoglobin

Hp = Hydrolytisches Peptid

HPLC = Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

IHP = Inosithexakisphosphat

Intron = nicht exprimierter Teil der DNA

IPP = Myoinosit-1,3,4,5,6-pentakisphosphat

ITP = Inosittetrakisphosphat

KBp = Kilo-Basepairs

M = molar

Mb = Myoglobin

N = normal

Propin = 3-Diethylaminopropin

PAS = Perameisensäure

pO_2 = Sauerstoffpartialdruck

$p50$ = Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins

PTH = 3-Phenyl-2-Thiohydantoin

Quadrol = N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin

Reagenz I = 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure, Natrium-salz

Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,2,5-trisulfon-säure, Trinatriumsalz

RP = reversed phase (Umkehrphase)

R-Struktur = lockere (relax) Struktur des Hb-Tetramers⁽¹⁹⁾

TFA = Trifluoressigsäure

TP = Tryptisches Peptid (nummeriert wie bei Humanhämoglobin)

TPCK = (N-Tosyl-L-phenylalanyl)chlormethan

Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

T-Struktur = kompakte (tense) Struktur des Hb-Tetramers⁽¹⁹⁾

Internationale und deutsche Abkürzungen der Aminosäuren:

D = Asp = Asparaginsäure

C = Cys = Cystein

N = Asn = Asparagin

V = Val = Valin

Asx = Asp oder Asn

M = Met = Methionin

T = Thr = Threonin

I = Ile = Isoleucin

S = Ser = Serin

L = Leu = Leucin

E = Glu = Glutaminsäure

Y = Tyr = Tyrosin

Q = Gln = Glutamin

F = Phe = Phenylalanin

Glx = Glu oder Gln

H = His = Histidin

G = Gly = Glycin

K = Lys = Lysin

A = Ala = Alanin

R = Arg = Arginin

P = Pro = Prolin

W = Trp = Tryptophan

Einleitung

Nur ein sehr anpassungsfähiges Molekül wie das Hämoglobin ist zur Sauerstoffversorgung der tierischen Organismen in den verschiedenen Lebensräumen in der Lage. Es erfüllt seine Funktion sowohl bei den Fischen, die den gelösten Sauerstoff aus dem Wasser aufnehmen müssen, als auch bei Vögeln, die in großen Höhen unter hypoxischen Bedingungen fliegen, wie die Streifengans (*Eulabeia indica* (Lath., 1790)) bei der Überquerung des Himalaya^(1,2). In einigen Fällen wurden die zur Anpassung an die Umwelt erfolgten Veränderungen der Hämoglobinstruktur bereits untersucht. Durch Vergleich mit ihren im Flachland lebenden Verwandten konnten die Mechanismen bei der Streifengans^(1,2) und dem Lama (*Lama guanicoe glama* (L., 1758))⁽³⁾ aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die äußeren Einflüsse (Leben im Hochland) auch beim Andenkondor (*Vultur gryphus*, L., 1758) zu einer Anpassung durch Veränderung der Hämoglobinstruktur geführt haben. Ein weiteres Motiv zur Aufklärung der Hämoglobinsequenz des Andenkondors liegt in der Möglichkeit, durch einen Vergleich mit der kürzlich bestimmten Primärstruktur des Storchenhämoglobins (*Ciconia ciconia* (L., 1758))⁽⁴⁾ einen Beitrag zur Diskussion der Verwandtschaft zwischen Neuweltgeiern und Störchen zu leisten. Ähnlichkeiten im Verhalten von Kondor und Storch regten zu anatomischen Vergleichen an, die Parallelen ergaben. Danach wären die Neuweltgeier mit den Altweltgeiern nur noch durch die gemeinsame ökologische Nische verbunden⁽⁵⁾. Ein Vergleich der Hämoglobinsequenzen kann zur Standortbestimmung der Neuweltgeier beitragen.

Schrifttum

1. Der geschichtliche Hintergrund des Hämoglobins

1864 beschrieb Hoppe-Seyler das "rote Pigment" in den Erythrozyten und nannte es "Hämoglobin"⁽⁶⁾. Gleichzeitig nahm er Untersuchungen zur Funktion vor. Bert erstellte 1872 durch quantitative Messungen die erste Sauerstoffdissoziationskurve⁽⁷⁾. Die frühesten Untersuchungen zur Funktion des Vogelblutes führte 1917 von Hasselbalch durch (Messungen der O_2 -Affinität von Taubenblut)⁽⁸⁾. Wastl und Leiner folgten 1931 mit Untersuchungen an Enten, Gänsen und Tauben⁽⁹⁾. Noch früher wagten sich die Chemiker an die Struktur des Hämoglobins. Schon 1853 hat Teichmann die prosthetische Gruppe, das Häm, abgetrennt und die nach ihm benannten Teichmannkristalle isoliert⁽¹⁰⁾. Die Hämstruktur wurde 1912 von Küster⁽¹¹⁾ vorgeschlagen und 1929 von Fischer⁽¹²⁾ durch Synthese bewiesen. Der Proteinanteil des Hämoglobins, wurde von Braunitzer^(13,14) 1961 aufgeklärt. Er bestimmte die Primärstruktur der beiden Proteinketten des adulten Humanhämoglobins. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse erstellte Perutz 1961 die Raumstruktur des Hämoglobins⁽¹⁵⁾.

2. Hämoglobinaufbau

2.1 Allgemeines

Hämoglobin ist aus 4 Polypeptidketten zusammengesetzt (Quartärstruktur). Zwei dieser Polypeptidketten sind jeweils identisch und werden als alpha- und beta-Ketten bezeichnet. So ergibt sich für die Hämoglobine der Vögel und Säuger die Strukturformel $\alpha_2\beta_2$.

2.2 Häm

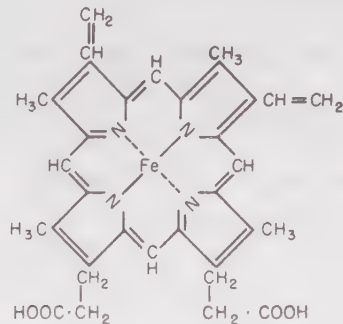


Abb. 1: Hämmolekül⁽¹⁶⁾

Jede dieser Ketten enthält eine prosthetische Gruppe, das Häm. Das Häm, Protoporphyrin IX, besteht aus 4 Pyrrolkernen (I, II, III, IV), die über Methinbrücken zu einem Ring verknüpft sind. Alle Pyrrolringe sind mit einem Methylrest versehen. An den Ringen I und II ist noch je ein Vinylrest angehängt. Die Pyrrolringe III und IV sind jeweils mit einem Propionsäurerest versehen. Im Zentrum des Hämkomplexes liegt ein Eisenatom, das nur in seiner zweiwertigen Form den Sauerstoff binden kann. Die vier N-Atome der Pyrrolringe stehen mit dem Eisenatom in Verbindung. Die fünfte Kontaktmöglichkeit besteht zur Aminosäure Histidin (proximales Histidin)

der Globinkette (in der alpha-Kette Position 87 und in der beta-Kette Position 92). Die sechste Bindungsstelle bleibt für den Sauerstoff frei. Der Sauerstoff hat je eine Verbindung zum Eisen des Hämkomplexes und eine zu einem Histidin (distales Histidin, Position 58 in den alpha- und 63 in den beta-Ketten) der Globinkette. Jedes dieser scheibenförmigen Hämmoleküle sitzt in einer Tasche, die von den Polypeptidketten in ihrer Raumstruktur gebildet werden⁽¹⁷⁾.

2.3 Polypeptidketten

Die Ketten bestehen aus linear aneinandergereihten Aminosäuren, die durch Peptidbindungen verknüpft sind (Primärstruktur). Bei allen Vögeln und Säugern sind die Ketten vom alpha-Typ aus 141 Aminosäuren und die vom beta-Typ aus 146 Aminosäuren zusammengesetzt.

Etwa 75% der Aminosäuren dieser Polypeptidketten bilden alpha-Helices (Sekundärstruktur). Zwischen den 8 Helices (A bis H-Helix) sind die Ketten direkt oder in ihren nicht helikalen Bereichen so gebogen, daß in diesem Knäuel eine Tasche für das Häm entsteht (Tertiärstruktur).

Vier Ketten, 2 alpha- und 2 beta-Ketten, lagern sich zu einem tetrameren Makromolekül Hämoglobin zusammen (Quartärstruktur).

Die Tertiär- und Quartär-Strukturen werden durch atomare Wechselwirkungen aufrecht erhalten, die in der Röntgenstrukturanalyse daran zu erkennen sind, daß die beteiligten Atome nicht mehr als 4 Angström voneinander entfernt sind⁽¹⁸⁾. Die Aminosäuren, zu denen diese Atome gehören, sind wegen dieser

Kontakte von besonderer Wichtigkeit, da sie die Funktion entscheidend beeinflussen.

Diese Aminosäuren gliedern sich in 5 Gruppen :

1. Hämkontakte (Aminosäuren, die das Häm in seiner Tasche mit Van der Waals'schen Bindungen festhalten)
2. α_1 - β_2 -Bindungsstellen (Aminosäuren, die wie die folgenden eine bedeutende Rolle beim Oxygenierungsprozeß spielen)
3. α_1 - β_1 -Bindungsstellen
4. Aminosäuren, an die eine Anlagerung von Polyphosphaten möglich ist.
5. Aminosäuren, an denen Wasserstoffionen eine Senkung der Sauerstoffaffinität bewirken (Bohreffekt).

3. Die Funktion des Hämoglobins

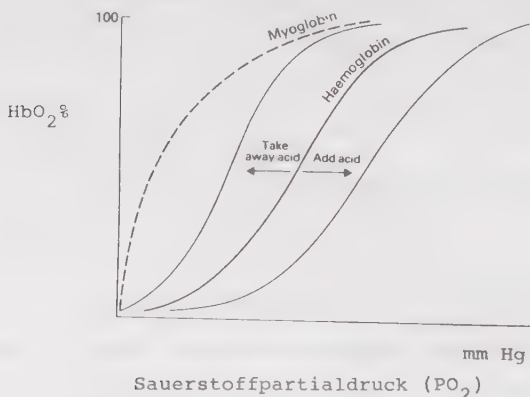
3.1 Allgemeines

Die Funktion des Hämoglobins besteht darin, den Sauerstoff in der Lunge aufzunehmen und über das Blut jeder Zelle im Körper zugänglich zu machen. Dort gelangt er (durch Diffusion) direkt oder wie im Muskel über das Speichermolekül Myoglobin zu den Mitochondrien. Entscheidend ist die reversible Bindung des Sauerstoffmoleküls an das Eisenatom. Dadurch und durch das Partialdruckgefälle vom arteriellen (z.B. beim Menschen 95 mmHg) zum venösen Blut (35 mmHg) wird die Aufnahme und Abgabe ermöglicht⁽¹⁹⁾.

3.2 Allosterie

Diese Funktion wird durch allosterische Effekte und Effektoren begünstigt. Sie erleichtern die Abgabe des Sauerstoffs im Gewebe. Ein Beispiel dafür ist die Zusammenlagerung von monomeren Ketten zu einem tetrameren Makromolekül. Die O_2 -Affinitätskurve bei Monomeren, wie z.B. dem Myoglobin, verläuft hyperbolisch. Beim tetrameren Hämoglobin entsteht eine sigmoidale Kurve.

Abb. 2: Sättigung des Hämoglobins mit O_2 in % bei steigendem Sauerstoffpartialdruck⁽¹⁹⁾



Das bedeutet, daß bei gleichem Sauerstoffpartialdruck die Differenz der Sauerstoffaffinitäten bei Tetrameren größer ist. Dadurch ist ein höherer Sauerstofftransport möglich. Durch die Anlagerung von Sauerstoff geht das Hämoglobintetramer von der kompakten T-Struktur in die lockerere R-Struktur über, die das Anlagern weiterer O_2 -Moleküle erleichtert⁽¹⁹⁾. Dies wird durch eine Häm-Häm-Wechselwirkung ermöglicht.

Weitere Effekte unterstützen dies:

1. Bohreffekt
2. Polyphosphate
3. Temperatur

3.2.1 Der Bohreffekt

Eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration bedingt eine Absenkung der O_2 -Affinität des Hämoglobins. Die gleiche Wirkung entsteht bei Erhöhung der CO_2 -Konzentration, die durch eine Carbamatbindung Protonen freisetzt. Durch die Bindung von vier O_2 -Molekülen werden 2 Protonen abgegeben⁽²⁰⁾.

3.2.2 Polyphosphate und Ionen

Die ansteigende Phosphatkonzentration verschiebt die O_2 -Affinitäts-Kurve nach rechts und verstärkt den sigmoidalen Verlauf. Die Phosphate unterstützen die Abgabe von Sauerstoff, indem sie die kompakte T-Struktur begünstigen.

Gleichsinnig wie Phosphate wirken mit ansteigender Konzentration H^+ , Cl^- , CO_2 . Bei Säugern wirkt überwiegend DPG⁽²¹⁾, bei Fischen ATP und GTP⁽²¹⁾. Bei Vögeln erzielen vor dem Schlupf ATP und DPG die größte Wirkung⁽²²⁾. Bei adulten Vögeln wird IPP zum wichtigsten Effektor, während der Einfluß von ATP abgenommen hat (23,24,25). Noch geringer ist die Wirkung von DPG. ($P_{50} \text{ IHP} > P_{50} \text{ IPP} > P_{50} \text{ ITP} > P_{50} \text{ ATP} > P_{50} \text{ 2,3DPG}$)^(26,27).

Abb. 3: Anstieg des P_{50} (Sauerstoffpartialdruck, bei dem 50% des Hämoglobins oxygeniert ist) gegen IHP-Konzentration (23)

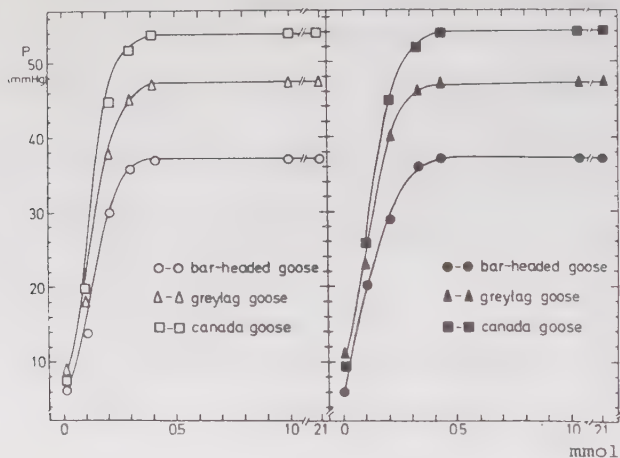
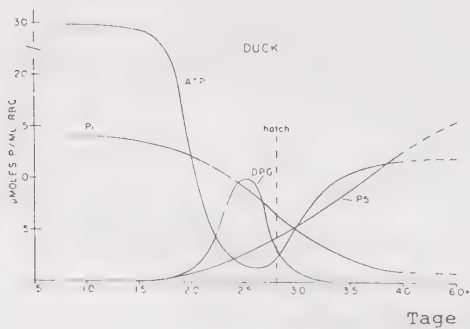


Abb. 4: Verlauf der Konzentrationen der verschiedenen Phosphate in der ontogenetischen Entwicklung der Ente (27)



4. Homologie

4.1 Homologie verschiedener Globinketten einer Spezies

Beim Vergleich verschiedener Globinketten (alpha, beta, Myoglobin) von menschlichen und tierischen Hämoglobinen wurden Ähnlichkeiten festgestellt. Durch Einfügen von Lücken (Braunitzer-Gaps) in die Sequenzen konnten die unterschiedlichen Kettenlängen ausgeglichen und eine Übereinstimmung erzielt werden⁽²⁸⁾. Stellt man z.B. die Sequenzen der menschlichen Globinketten untereinander und versucht durch Einfügen von Gaps die maximale Übereinstimmung zu erreichen, so entsteht folgendes Bild (s. Abb 5).

Abb. 5: Homologer Vergleich der alpha- und beta-Globinketten und des Myoglobins des Menschen⁽²⁹⁾

Pos. 1-26

alpha	V	L	S	P	A	D	K	T	N	V	K	A	A	W	G	K	V	G	A	H	A	G	E	Y	G
beta	V	H	L	T	P	E	E	K	S	A	V	T	A	L	W	G	K	V	N		V	D	E	V	G
Mb	G	L	S	D	G	E	W	Q	L	V	L	N	V	W	G	K	V	E	A	D	I	P	G	H	G
	1		5						10						5				20				5		

Durch einfaches numerisches Abzählen der Aminosäureaustausche ergibt sich ein quantitatives Maß der Ähnlichkeiten (Homologie) der zu vergleichenden Ketten, wie folgende Tabelle für die menschlichen Ketten zeigt.

	alpha	zeta	beta	gamma	delta	epsilon	Mb
alpha	-						
zeta	61	-					
beta	84	96	-				
gamma	85	94	10	-			
delta	89	91	39	41	-		
epsilon	92	92	36	40	30	-	
Mb	115	115	118	117	118	120	-

(Goodman⁽²⁹⁾)

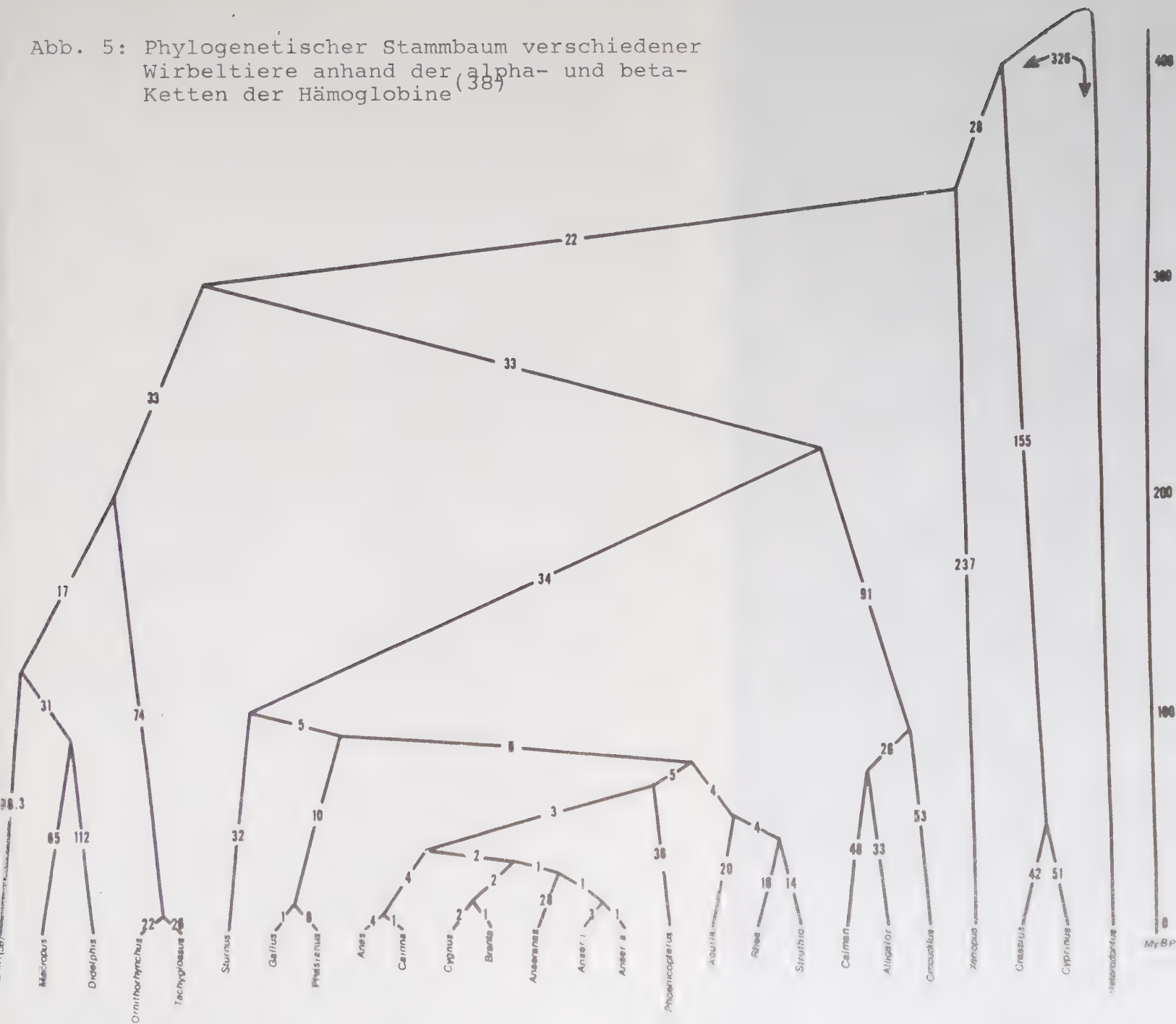
Die Auswertung dieser Tabelle ergibt eine Gruppe vom beta-Kettentyp (beta, gamma, delta, epsilon, Mb) und eine Gruppe vom alpha-Kettentyp (alpha, zeta). Alle diese homologen Ketten haben eine fast identische Raumstruktur, (Tertiärstruktur) und selbst bei einem Vergleich von alpha, beta, gamma, delta, epsilon, Mb sind noch 21 Positionen in allen Ketten identisch⁽²⁸⁾. Diese mehr als zufällige Analogie läßt auf eine molekulare Verwandtschaft der verschiedenen Globine schließen⁽³⁰⁾. Als Ursache wird angenommen, daß diese Ketten von einem Urglobin abstammen, dessen "Ur-Gen" sich verdoppelt hat (durch ein nicht homologes Crossing-Over bei der Meiose). Nach dieser Genduplikation entwickelte sich jeder Genlocus eigenständig weiter. Der Vorteil für die Evolution liegt darin, daß nun ein Genlocus von der Funktion unabhängig mutieren kann, ohne einen Gesamtausfall zu verursachen^(30,31).

4.2 Homologie zwischen Tierspezies und Evolution

Auch bei einem derartigen homologen Vergleich zwischen entsprechenden Ketten verschiedener Tierarten wird weitgehende Übereinstimmung der Sequenzen festgestellt. Zum Beispiel bestehen zwischen der Graugans (*Anser anser* (L., 1758))^(2,30) und der Streifengans⁽¹⁾ in den alpha-Ketten drei Unterschiede und in den beta-Ketten ein Unterschied. Die Hämoglobine der Graugans und des Steinadlers (*Aquila chrysaetos* (L., 1758))⁽³³⁾ unterscheiden sich in den alpha-Ketten in 17 und in den beta-Ketten in 9 Positionen. Wie beim Cytochrom C liegen auch beim Hämoglobin eine große Anzahl von Daten vor (ca. 200 tierische und 546 abnormale menschliche Hämoglobinketten)^(34,35). Je näher zwei Tierarten phylogenetisch miteinander verwandt sind, desto weniger Austausche findet man beim Vergleich der Aminosäuresequenzen ihrer Hämoglobine⁽³⁰⁾. Dadurch besteht die Möglichkeit, einen Stammbaum der molekularen Evolution der Hämoglobinketten aufzustellen. Durch das Einsetzen der chronologischen Daten aus den paläontologischen Funden konnte für das Hämoglobin errechnet werden, daß alle 8 - 10 Millionen Jahre mit einer sich durchsetzenden Mutation zu rechnen ist^(28,31,36). Mit der zunehmenden Komplexizität der Systeme für die Sauerstoffversorgung wurden die Lebewesen immer abhängiger von der Funktion des Hämoglobins. Dies zeigt sich in einer Verminderung der Mutationsrate während der Evolution. Viele Aminosäurepositionen sind für die Funk-

tion essentiell geworden. Dies ist bei den Hämbindungsstellen der Fall, ebenso wie bei $\alpha_1\beta_1$ -, $\alpha_1\beta_2$ - und bei den Phosphatbindungsstellen. Die Mutationsraten der verschiedenen Globinketten (α^A , α^D und β) sind verschieden. Bei Huhn und Fasan beträgt das Verhältnis der Mutationsraten $\beta : \alpha^A : \alpha^D$ 1 : 2,5 : 4⁽³⁷⁾

Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Wirbeltiere anhand der alpha- und beta-Ketten der Hämoglobine (38)



5. Genetik

5.1 Speicherung des Genetischen Codes in der DNA

Die lineare Anordnung der Aminosäuren in den Proteinen wird durch eine lineare Folge von Basen in der DNA (Desoxyribonucleinsäure) bestimmt⁽³⁹⁾. Die zwanzig Aminosäuren werden, ebenso wie Start- und Stopcodons (z.B.: UAA, UGA, UAG) von 4 verschiedenen Nukleotidbasen (Adenin, Cytosin, Guanidin, Thymin) in Form von Tripletts codiert (s. Abb. 7). Insgesamt sind 4^3 verschiedene Tripletts möglich.

		Second codon base →				Third codon base ↓
		U	C	A	G	
First codon base ↑	U	UUU Phe (2) UUC Phe UUA Leu (6) UUG Leu	U CU Ser (6) UCC Ser UCA Ser U CG Ser	UAU Tyr (2) UAC Tyr UAA (ochre) CT UAG (amber) CT	UGU Cys (2) UGC Cys UGA (umber) CT UGG Trp (1)	U C A G
	C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro (4) CCC Pro CCA Pro CGB Pro	CAU His (2) CAC His CAA Gln (2) CAG Gln	CGU Arg (6) CGC Arg CGA Arg CAG Arg	U C A G
	A	AUU Ile (3) AUC Ile AUA Ile AUG* Met (1)	ACU Thr (4) ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn (2) AAC Asn AAA Lys (2) AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
	G	GUU Val (4) GUC Val GUA Val GUG* Val	GCU Ala (4) GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp (2) GAC Asp GAA Glu (2) GAG Glu	GGU Gly (4) GGC Gly GGA Gly GGA Gly	U C A G

Abb. 7: Der Genetische Code⁽³⁹⁾

Wie aus der Abbildung zu ersehen, kann die Änderung einer Base im Triplet einen Austausch der von ihr codierten Aminosäure bewirken (mgl. auch silent mutation d.h. ohne Änderung der codierten Aminosäure). Bei der Sichelzellanämie

des Menschen bewirkt eine Änderung des zweiten Nukleotids der 6. Aminosäureposition von Adenosin nach Thymidin im Gen der beta-Kette einen Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Valin im Globin. Diese beta^S-Ketten bilden zusammen mit normalen alpha-Ketten das Hämoglobin S mit erhöhter Aggregationsneigung. Heterozygoten Trägern verschafft diese Mutante einen Selektionsvorteil in Malaria verseuchten Gebieten⁽¹⁶⁾.

5.2 Globingencluster auf Chromosomen

Beim Menschen liegen die Gene für die alpha-artigen⁽⁴⁰⁾ Globine auf dem Chromosom 16 und die beta-artigen auf dem Chromosom 11 in Clustern (Haufen) zusammen⁽⁴¹⁾. Eben solche Cluster bilden beim Huhn (Gallus gallus) die Globingene der alpha-artigen (π , α^A , α^D)⁽⁴²⁾ und die der beta-artigen (ρ , β^H , β , ϵ)⁽⁴³⁾ Hämoglobine.

Abb. 8: Alpha-Gencluster beim Huhn⁽⁴²⁾

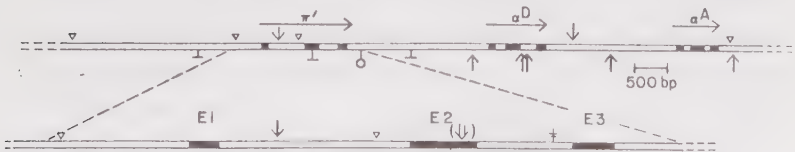
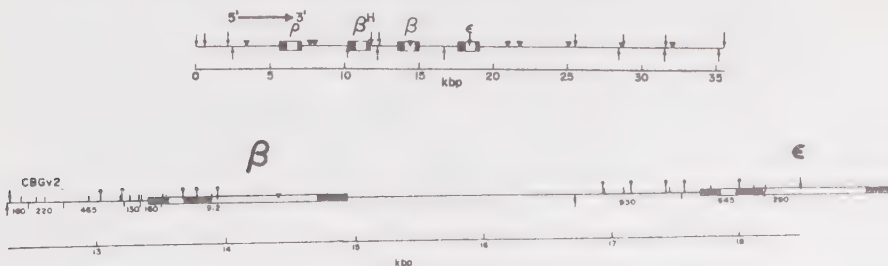


Abb. 9: Beta-Gencluster beim Huhn⁽⁴³⁾



Auf welchem der 2x39 Chromosomen sie sich befinden, ist bisher nicht genau bekannt. Die beta-Ketten befinden sich auf einem der zwei größten Makrochromosomen, während die alpha-Ketten auf den Mikrochromosomen 10 - 15 zu suchen sind^(44,45).

5.3 Der Aufbau eines Gens im Gencluster

Im Gencluster auf der DNA liegen die embryonalen Globingene links (am 5'-Ende) und die adulten rechts (am 3'-Ende). Die Reihenfolge entspricht ihrer Exprimierung in der Ontogenese. Eine Ausnahme hiervon bilden die Globingene vom beta-Typ beim Huhn (*Gallus gallus*). Hier liegt die embryonale epsilon-Kette rechts von den adulten Ketten⁽⁴³⁾. Die Geninformation auf der DNA ist durch zwei Introns (nichtcodierende Einschübe) unterbrochen. Bei der alpha-Kette trennt das Intron 1 die ersten beiden Basen des Codons der 31. Aminosäure von der letzten Base. Das zweite Intron schiebt sich zwischen das Codon der 99. und 100. Aminosäure ein. Bei der beta-Kette liegen die Introns zwischen der 30. und 31. bzw 104. und 105. Aminosäure⁽⁴³⁾. An den Anfang und das Ende eines Gens schließen sich jeweils "flanking regions" an, die nicht exprimiert werden. Vor dem ersten Exon dienen sie als Erkennungs- (CAT-Box) und Haftungsstellen (ATA-Box)⁽⁴³⁾ der RNA-Polymerasen bei der Synthese der mRNA^(30,46) (s. Abb. 10). Nach dem 3. Exon steht ein Terminationscodon⁽⁴⁶⁾. Die pro-mRNA wird dann durch Processing und Splicing von den Introns und "flanking regions" befreit⁽³¹⁾.

2

Polyadenosinmonophosphate bewirkt.

6. Aufklärung der Primärstruktur

6.1 N-terminale Sequenzanalyse nach Edman

1949 stellte Edman ein Verfahren vor, das einen stufenweisen Abbau eines Proteins erlaubt⁽⁴⁸⁾. Eine chemische Modifizierung der N-terminalen Aminosäure ermöglicht deren Abspaltung. Das Aminosäurederivat wird durch Dünnschichtchromatographie^(49,50), Gaschromatographie⁽⁵¹⁾, Massenspektroskopie oder HPLC⁽⁵²⁾ identifiziert. Das erhaltene Restpeptid kann je Schritt um eine weitere Aminosäure abgebaut werden. Dieser Vorgang ist 40 - 60mal wiederholbar. Viele Proteine sind jedoch länger, deshalb spaltet man sie mit chemischen oder enzymatischen Methoden in kleinere Bruchstücke, am besten in Peptide von 10 - 15 Aminosäuren. Durch verschiedene Trennverfahren können diese Peptide voneinander getrennt werden, wie zum Beispiel:

1. Ionenaustauscherchromatographie
2. Gelchromatographie
3. HPLC über Umkehrphase (reversed phase)
4. Dünnschichtelektrophorese

Die Summenformel aus der Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse⁽⁵³⁾ dient ebenso zur Charakterisierung der Peptide wie die Dünnschichtchromatographie⁽⁵⁴⁾ mit anschließenden Farbttests. In diesen Farbttests können folgende Aminosäuren spezifisch angefärbt werden: Tyr/His^(55,56), Trp⁽⁵⁷⁾, Arg⁽⁵⁸⁾, Met/Cys⁽⁵⁹⁾. Die isolierten und identifizierten

Peptide werden sequenziert. Durch Zusammensetzen, ähnlich einem Puzzlespiel, ermittelt man die Sequenz des gesamten Proteins. Bei gut untersuchten Proteinen (Hämoglobin und Cytochrom C etc.) ist eine homologe Zuordnung möglich (s. Kap. Homologie⁽²⁸⁾). Bei allen anderen Proteinen benötigt man verschiedene Spaltungsmethoden, um durch eine Überlappung der Bruchstücke deren Reihenfolge festzustellen.

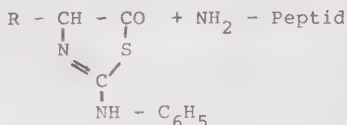
6.1.1 Der Reaktionsmechanismus

Der Reaktionsmechanismus der N-terminalen Sequenzanalyse besteht aus drei Schritten:

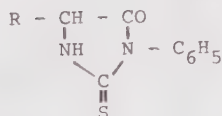
1. Anlagerung



2. Zyklisierende Spaltung



3. Konversion



Durch die Anlagerung von Phenylisothiocyanat im alkalischen Milieu an die N-terminale alpha-Aminogruppe des Peptids entsteht ein Phenylthiocarbamylderivat (1.). Dieses zyklisiert in stark saurem Milieu und spaltet das Restpeptid ab (2.). Das Thiazolinonderivat wird extrahiert und wegen seiner Instabilität in das isomere stabile 3-Phenyl-2-Thiohydantoin (PTH) überführt⁽⁶⁰⁾ (3.).

6.2 Automatische Sequenzanalyse

6.2.1 Flüssigphasen-Sequenator (Liquid phase)

Edman automatisierte 1967 die Reaktion in einem schnell rotierenden Glasbecher (spinning cup)⁽⁶¹⁾. Durch Anheften von sulfonierten Senfölen an das Lysin der tryptischen Peptide konnte deren Löslichkeit in organischen Solvenzien gesenkt und damit die Auswaschung der kleineren Peptide herabgesetzt werden. Zur Verwendung kommen die Puffersubstanzen Quadrol^(49,62) und Diäthylaminopropin⁽⁶³⁾. Durch eine zusätzliche zyklisierende Spaltung ist eine maximale Ausbeute von 97% möglich⁽⁶⁴⁾.

6.2.2 Gasphasen-Sequenator (Gas phase)

Beim Gasphasen-Sequenator werden die Polypeptide auf eine poröse Glasfiberscheibe aufgetragen. Daran strömen die gasförmigen Reagenzien vorbei. Bei dieser Methode werden nur geringe Mengen Protein benötigt (Mikromethode)^(65,66).

6.2.3 Festphasen-Sequenator (Solid phase)

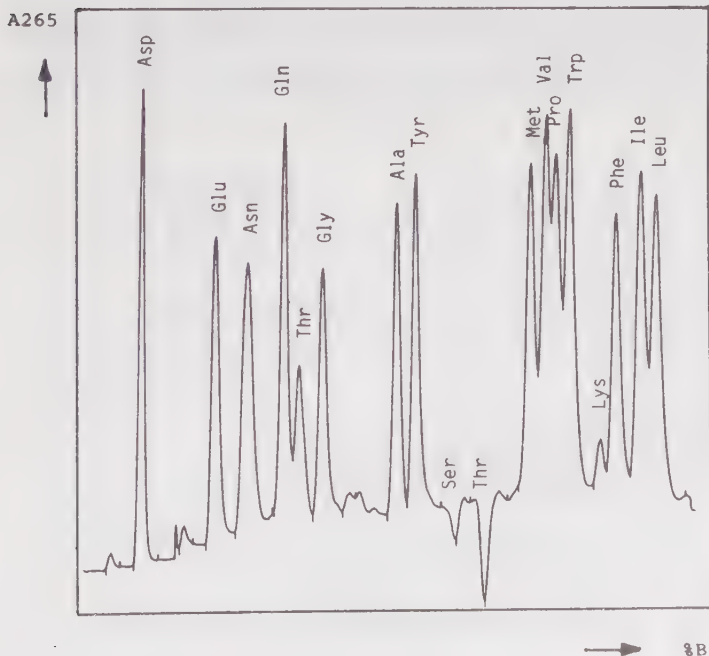
Im Festphasen-Edmanabbau werden die Peptide an einen Träger (z.B.: Polystyrolharz, poröses Glas) kovalent gebunden und die Reagentien in flüssiger Form daran vorbei geleitet^(67,68,69).

6.3 PTH-Identifizierung

In unserer Abteilung wird für die Identifizierung der PTH-Aminosäurederivate die Dünnschichtchromatographie in 3 verschiedenen Lösungsmittelsystemen auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator verwendet^(50,51). Falls dafür die Mengen zu gering sind, lassen sich die PTH's auf einer RP-Säule (reversed phase) durch HPLC auftrennen und identifizieren⁽⁵²⁾.

Abb.11⁽⁷⁰⁾: Trennung von PTH-Aminosäuren mittels

HPLC-RP-18 s. III. 8.2.2.1.



6.4 Spaltung der Proteinketten in kleinere Bruchstücke

Proteine können durch enzymatische und chemische Methoden gespalten werden.

Dafür stehen folgende Methoden zur Verfügung:

6.4.1 Enzymatische Spaltungen

(a) Tryptische Spaltung

Trypsin spaltet an den Carboxylseiten der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin⁽⁷¹⁾.

(b) Limitiert-tryptische Spaltung

Durch eine Citraconilierung der epsilon-Aminogruppe des Lysins findet nur eine Spaltung C-terminal von Arginin statt⁽⁷²⁾.

(c) Spaltung mit Chymotrypsin

nach Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin^(73,74).

(d) Peptische Spaltung

Pepsin spaltet C-terminal von Trp, Phe, Tyr, Met, Leu^(75,76).

(e) Staphylococcus aureus V8

spaltet C-terminal von Glu und Asp⁽⁷⁷⁾

(f) Weniger spezifische Enzyme für die Peptidspaltung:

1. Thermolysin⁽⁷⁸⁾, 2. Carboxypeptidase⁽⁷⁹⁾,
3. Papain⁽⁷⁹⁾, 4. Subtilisin⁽⁷⁹⁾, 5. Elastase⁽⁷⁹⁾.

6.4.2 Chemische Spaltungen

(a) Spaltung mit Bromcyan

nach Methionin⁽⁸⁰⁾.

(b) Hydrolytische Spaltung der Asp-Pro-Bindung⁽⁸¹⁾

6.5 Peptidtrennung

6.5.1 Ionenaustauscherchromatographie

Die verschiedene Ladung der Peptide oder Proteine bewirkt eine unterschiedliche reversible ionische Bindung an die funktionellen Gruppen des Austauschers, die an verschiedene Träger (Polystyrolharz, Cellulose, ect.) gebunden sein können. Durch gleichgeladene Ionen des Puffers wird das Präparat verdrängt und eluiert⁽⁸²⁾.

6.5.2 Gelchromatographie

In einem Material aus einheitlich großen Kügelchen mit schwammartiger Struktur diffundieren kleinere Moleküle in die Poren dieser Kügelchen. Durch das Heraus- und Hineindiffundieren ist ihre Fließgeschwindigkeit herabgesetzt (Molekularsiebeffekt)⁽⁸²⁾.

6.5.3 HPLC über Umkehrphase (reversed phase)

HPLC über Umkehrphase besitzt ein großes Auflösungsvermögen. An polare Gruppen der porösen Kieselgelkügelchen sind apolare organische Gruppen angelagert. Diese treten mit den apolaren Resten der Peptide über Van der Waals'sche Kräfte in Wechselwirkung. Deshalb werden die apolaren Peptide im

polaren Lösungsmittel langsamer transportiert^(70,83,84,85).

6.5.4 Dünnschichtelektrophorese

Die Dünnschichtelektrophorese wird als Flachbettelektrophorese mit Cellulose als Trägermaterial verwendet. Die Peptide trennen sich im elektrischen Feld nach Ladung und Größe auf⁽⁵⁴⁾.

III. Material und Methoden

1. Gewinnung von Globin

1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme (10ml) erfolgte bei adulten Hühnern (Leghorn A, Rhodeländer und Sonnerathuhn) durch Punktion der Vena jugularis oder durch Herzpunktion (nach Betäubung) im Institut für Geflügelkrankheiten. Den adulten Andenkondoren der Falknerei Schmidt, Bad Wörishofen, wurde das Blut aus der Vena cutanea ulnaris entnommen. Die Gerinnung wurde mit 4ml Vetren^R (=400 I.E. Heparin) verhindert.

1.2 Herstellung der Erythrozytensuspension

Das Vollblut wurde bei ca. 200 g 15 min. zentrifugiert. Das Serum wurde verworfen und das Sediment 3x mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Diese Behandlung entfernte alle Serumproteine. Das Eintropfen der Erythrozytensuspension in flüssigen Stickstoff ermöglichte eine längere Lagerung bei -70°C und eine partielle Entnahme.

1.3 Hämolyse

Durch Auftauen und Zugabe desselben Volumens Aqua bidest zur Erythrozytensuspension werden die Zellwände zerstört und

das Hämoglobin tritt aus. Die Zentrifugation bei ca. 40000 g (30 min.) trennt Membranen und Kerne von dem in flüssiger Phase vorliegenden Hämoglobin. Das Waschen der abgesetzten Bestandteile mit 0,9% NaCl-Lösung ermöglicht, eine höhere Ausbeute an Hämoglobin.

1.4 Titerbestimmung

Die Hämoglobinkonzentration wurde nach Cannan⁽⁸⁶⁾ bestimmt.

Transformationslösung (=Trafolösung):

0,16% Kaliumhexacyanoferrat

0,16% Kaliumcyanat

in Aqua bidest

Zu 4 ml Trafolösung werden 20 µl Hämoglobinlösung gegeben.

Nach 15 min. wird die Extinktion bei 540 nm gegen den Leerwert der Trafolösung gemessen. Die Berechnung der Hämoglobinkonzentration in mmol/l (c_{Hb}) wird nach folgender Gleichung durchgeführt:

$$c_{\text{Hb}} = \frac{e_{540} \times F}{44 \times 1,0}$$

e_{540} = Extinktion bei 540 nm

F = Verdünnungsfaktor

44 = mMolarextinktion von CN-Met-Hb

1,0 = Schichtdicke der Lösung in der Küvette in cm

1.5 Hämabspaltung

Die Abspaltung der prosthetischen Gruppe erfolgte nach der Methode von Rossi-Fanelli⁽⁸⁷⁾. Die Hämoglobinlösung wurde langsam tropfenweise und unter ständigem Rühren in salzsaures Aceton von -18°C gegeben. Nach 1 h Absetzzeit bei -20°C konnte der Überstand des ausgeflockten Globins verworfen werden. Das Globin wurde abzentrifugiert und noch mindestens 3x mit kaltem Aceton (-20°C) gewaschen, danach in ca. 50 ml Aqua bidest gelöst und zur Entfernung des restlichen Acetons abrotiert. Die Aufbewahrung erfolgte im lyophilisierten Zustand.

2. Komponententrennung

2.1 Analytisch mit Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese trennt nach Ladung, Größe und Gestalt der Moleküle.

Größe der Rundgele: 7 cm x 0,5 cm

Zusammensetzung der Gele: 10% Acrylamid-Bisacrylamid
0.4 M Tris/HCl-Puffer pH 8,7

Elektrophoresepuffer: 0,07 M Tris-Glycin pH 8,3

Auf die Polyacrylamidgele wurde ca. 40 µg, mit 50% Saccharose beschwerte native Hämoglobinlösung aufgetragen. Nach 2 min. Konzentrierung (1 mA/Gel) lief die Elektrophorese 60 min. (4,5 mA/Gel). Die Färbung mit 1% Amidoschwarz-(10B)-Lösung in 7% Essigsäure und anschließende Entfärbung

und Fixierung in 7% Essigsäure erlaubte eine Konservierung^(88,89,90).

3. Kettentrennung

3.1 Analytisch mit Tritongelelektrophorese

Die Trennung erfolgte im denaturierten Zustand nach Ladung, Größe und hydrophobem Charakter der Moleküle. Diese Methode wurde zur analytischen Kettentrennung und zur Reinheitsprüfung der auf CM-Cellulose getrennten Ketten verwendet.

Größe der Rundgele: 7 cm x 0,5 cm

Zusammensetzung der Gele: 12% Acrylamid-Bisacrylamid
2% Triton X-100
0,5% N,N'-Tetramethylethylen-
diamin

5% Essigsäure

8 M Harnstoff

Elektrophoresepuffer: 5% Essigsäure

Probenpuffer: 8 M Harnstoff

10% Essigsäure

10% beta-Mercaptoäthanol

Nach 90 min. Vorelektrophorese (200 V) und anschließendem Pufferwechsel betrug die Laufzeit, nach dem Auftragen von 20 - 40 µg Protein, noch 3 h 50 min. (150 V). Färbung und Fixierung siehe 2.1 (Disk)^(91,92).

3.2 Präparativ mit CM-Cellulose

Die präparative Kettentrennung erfolgt mit Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose. Die Probe (60 - 480 mg) wurde in 10ml Startpuffer gelöst und der pH-Wert mit 0,2% Essigsäure gesenkt.

Säule: 2,5 cm x 18 cm
CM 52 microgranular preswollen

Startpuffer: 8 M Harnstoff
0,02 M Natriumacetat
0,2% Mercaptoäthanol
pH 5,25

Gradient A: logarithmisch 300 ml Startpuffer
300 ml " + 0,09 M NaCl
Gradient B: logarithmisch 600 ml Startpuffer + 0,09 M NaCl
600 ml " + 0,16 M NaCl
Gradient C: logarithmisch 600 ml Startpuffer + 0,16 M NaCl
600 ml " + 0,50 M NaCl

Durchflußrate: 40 ml/h

Fraktionen: 10 ml

Für den logarithmischen Gradienten wurden im geschlossenen vorderen Gefäß 300 ml Startpuffer vorgelegt, die gleiche Menge kam in die hintere, in Reihe geschaltete offene Kammer. Bei einem linearen Gradienten sind beide Kammern geöffnet. Nach der Elution der α^D - und α^A -Ketten wurden mit Gradient C die beta-Ketten konzentriert in wenigen Fraktionen erhalten. Die jeweilige Salzkonzentration läßt sich durch Leitfähigkeitsmessungen bestimmen. Die Extinktion des Eluats wurde mit einem Durchflußphotometer (ISCO UA-5)

bei 280 nm vermessen. Fraktionen, die vermutlich Ketten enthielten, konnten direkt aus dem Eluat auf Tritongeleelektrophorese aufgetragen werden und auf Reinheit und Konzentration untersucht werden. Bei großen Mengen der vereinigten Gipfelfraktionen (>120 ml) wurde kurze Zeit gegen fließendes Wasser dialysiert, am Rotationsverdampfer unter Vakuum eingeeengt und über Sephadex G-25 medium in 0,1 N HAC (2,5 x 130 cm) entsalzt. Bei kleineren Mengen konnte direkt auf die Sephadex G-25-Säule aufgetragen werden. Das Eluat wurde eingeeengt und lyophilisiert.

4. Proteinmodifizierung

4.1 Oxidation mit Perameisensäure⁽⁹³⁾

Die Löslichkeit der Ketten und die Zugänglichkeit für die Enzyme wurde durch schonende Oxidation der Cysteine und Methionine erhöht, ohne empfindliche Aminosäuren zu schädigen. Ameisensäure wurde mit 10% Perhydrol (30% H_2O_2) 1 h im Dunkeln umgesetzt. 7,5 mg - 30 mg Globinketten wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß in möglichst wenig Ameisensäure gelöst (max. 100 μ l). Die gelöste Probe und die Perameisensäure wurden bis knapp über den Gefrierpunkt abgekühlt. Die gelöste Probe wurde mit max. 200 μ l Perameisensäure vermengt und 15 min bei dieser Temperatur oxidiert. Die Reaktion wurde durch Überführen der Probe in einen Spitzkolben mit 10 ml Wasser und Lyophilisation, unter ständiger Kühlung (mit Alkohol von -30 °C) beendet.

5. Proteinspaltungen

5.1 Enzymatisch mit TPCK-Trypsin

Die oxidierten alpha^A- und beta-Ketten (7,5 -30 mg) wurden in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Mit Ammoniak wurde die Probe auf pH 11 gebracht und durch Zugabe von 1 - 1,5% TPCK-Trypsin die Spaltung gestartet. Durch das Absinken des pH-Wertes konnte der Verlauf der Spaltung beobachtet werden. Nach 2 Stunden wurde mit Essigsäure der pH-Wert auf 9 eingestellt und wieder 1 - 1,5% Trypsin zugegeben. Durch Titration mit Essigsäure wurde die Spaltung beendet (pH >4). Die alpha^D-Ketten wurden nur je eine Stunde bei pH 11 und 9 gespalten.

5.2 Hydrolytische Spaltung der Asp/Pro-Bindung

Die nativen Ketten wurden in 1 ml 6 M Guanidin-HCl in 70%-iger Ameisensäure gelöst und 60 h bei 42 °C inkubiert. Mit 0,5 ml 8 M Harnstoff verdünnt, wurde die Probe über Sephadex G-50 fine in 10% Ameisensäure, 8 M Harnstoff getrennt. Der Trennverlauf wurde über ein Durchflußphotometer bei 280 nm aufgezeichnet .

Säule:	2,5 cm x 200 cm
	Sephadex G-50 fine
Puffer:	10% Ameisensäure
	8 M Harnstoff

Flußrate: 16 ml/h

Fraktionen: 20 min

Die Entsalzung des Pro-Peptids erfolgte entweder über Sephadex G-25 medium in 1 N Essigsäure (2,5 x 130 cm) oder über Polyacrylamid Biogel P4 in 10% Ameisensäure (2,5 x 130cm). Vor dem Lyophilisieren mußte die Ameisensäure im Rotationsverdampfer entfernt werden.

6. Peptidtrennung

6.1 Gelchromatographie

Für fast alle bisher aufgeführten Entsalzungen wurde die Gelfiltration verwendet. Weiterhin wurde sie auch für die Vorfraktionierung tryptischer Peptidgemische eingesetzt. Die Peptidgemische wurden auf 2ml eingeeengt und per Hand auf die Säule aufgetragen.

Säule: 2,5 cm x 200 cm

Sephadex G-25 fine

Puffer: 0,1 N Essigsäure

Flußrate: 21 ml/h

Fraktionen: 7 ml/20 min

Ein Durchflußphotometer vermaß die Trennung bei 280 nm. Danach wurde die Extinktion der Fraktionen mit einem diskontinuierlichen Photometer bei 230 nm vermessen. Die vereinigten Gipfelfraktionen wurden auf unter 2 ml eingeeengt. Durch Dünnschichtelektrophorese (siehe 6.3.) wurde die Qualität und Quantität der darin enthaltenen Peptide festgestellt.

6.2 RP-HPLC

Die tryptischen Peptidgemische wurden entweder nach Vorfraktionierung durch Gelfiltration oder direkt mit HPLC über Umkehrphase getrennt.

Material:

HPLC-Gerät: Beckman

Gradient Liquid Chromatograph Modell

mit Controller 421, Pumpen 112,

Mischkammer

Photometer: Biotronik BT 3030

Schreiber : Shimadzu C-R1 A oder C-R2 A

Säulen: 4,6 mm x 250 mm, Edelstahl

Die Säulen wurden mit folgenden Füllmaterialien mit dem Packgerät Shandon von Gynkotheke selbst gefüllt.

Füllmaterial:

LiChrosorb RP 2, 7 μm (Merck)

LiChrosorb RP 8, 7 μm (Merck)

LiChrosorb RP 18, 5 μm (Merck)

Vydak^R RP 18, 10 μm (Chrompack)

Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat pH 6

oder 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)

Puffer B: 100% Acetonitril (mit Essigsäure auf gleiche Extinktion wie Puffer A gebracht)

Gradient: 0 - 65% Puffer B, meist 1%/min

Flußrate: 1 - 2 ml/min

Proben: 5 - 500 μl wässrige Lösung
von 1 - 150 nmol Peptidgemisch

Die Detektion mit dem Durchflußphotometer erfolgte bei 230 nm. Nach der manuellen Fraktionierung wurden die Gipfel im Stickstoffstrom zur Entfernung des Acetonitrils oder der TFA eingengt und durch Lyophilisieren vom Ammoniumacetat befreit. Aus diesen Fraktionen wurden zur Reinheitsprüfung und Quantifizierung Aliquote für die Dünnschichtelektrophorese (0,5 - 2,5 nmol) und Aminosäureanalyse (2 - 15 nmol) entnommen.

6.3 Dünnschichtelektrophorese

Neben der Reinheitsprüfung und der Mengenabschätzung wurde die Dünnschichtelektrophorese auch zur präparativen Trennung bis 50 nmol verwendet. Durch gleichzeitiges Fönen der Platten beim Auftragen war es möglich bis 30 µl wässrige Peptidlösung aufzutragen. Als Referenz diente Lysin. Die Platten wurden gleichmäßig mit Puffer eingesprüht und sofort in die gekühlte Elektrophoresekammer gelegt.

Material:

Platten: DC-Fertigplatten, 10 x 20 cm

Celluloseschicht 0,1 mm

Elektrophoresepuffer: 5% Pyridin

5% Aceton

2,2% Essigsäure

in Wasser

pH 5,4

Laufzeit: 60 - 90 min

Spannung: 450 Volt (12 - 15 mA)

Die Platten wurden bei 80 °C (10 min) getrocknet, zur Sichtbarmachung der Peptide mit Ninhydrin besprüht und 5 min bei 80 °C entwickelt. Peptide mit Tyrosin und Histidin konnten mit diazotierter Sulfanilsäure (Pauly-Reaktion^(55,56)) nachgewiesen werden. Durch andere Farbttests war es möglich Arginin⁽⁵⁸⁾, Tryptophan⁽⁵⁷⁾, Cystein- und Methioninpeptide⁽⁵⁹⁾ zu identifizieren. Bei präparativen Trennungen wurden nur drei schmale Banden (2 mm) angefärbt. Die peptidhaltigen Bereiche wurden ausgekratzt und mit 0,1 N Essigsäure eluiert.

7. Aminosäureanalyse⁽⁹⁵⁾

Für die Erstellung der Bruttoformeln der Peptide und Ketten wurden 2 - 15 nmol 20 h bzw. 200 h einer sauren Hydrolyse in 5,7 N HCl (0,2 - 0,3 ml) bei 110°C unterzogen. Cystein- und Methionin-haltige Peptide wurden vorher oxidiert (PAS)⁽⁹³⁾. Tryptophane mußten durch Zugabe von 5,7% Thioglykolsäure vor Zerstörung geschützt werden⁽⁹⁴⁾. Die Proben wurden durch Vakuumzentrifugation getrocknet und in 0,2 N Citratpuffer (pH 2,2) gelöst. Die chromatographische Auftrennung und Quantifizierung erfolgte mit einem Analysator 121C von Beckman (angeschlossen der Rechner Digital PDP-8/E von Digital Equipment) oder dem Analysator LC 5000 von Biotronik (mit Rechner Shimadzu C-R2 A).

8. N-Terminaler Aminosäureabbau

8.1 Automatische Sequenzanalyse

Der schrittweise Aminosäureabbau wurde automatisch im Sequenator (Beckman 890B, 890C, 890CII) nach Edman und Begg^(48,60,61) durchgeführt. Es wurden mindestens 10 nmol eingesetzt.

Der Abbau erfolgte nach zwei Methoden:

A. "Quadrolprogramm"

Mit 0,25 M Quadrol als Kupplungspuffer wurden Globinketten und mit Reagenz IV⁽⁶²⁾ umgesetzte Lysinpeptide abgebaut. Die Konversion erfolgte automatisch im Autokonverter (Sequemat P-6 von Kontron Technik) bei 60°C mit 3 M TFA.

B. "Propinprogramm"

In Anwesenheit des Kupplungspuffers 1,2 M Diäthylaminopropin (pH 9) wurden Arginin-Peptide, C-terminale hydrolytische Pro-Peptide (alpha Pos. 100 -141 bzw. beta 99 - 146), kleine hydrophile (<4 As.) und große hydrophobe mit Reagenz I umgesetzte Peptide analysiert. Die Konversion erfolgte manuell mit 3 M TFA bei 80°C (14 min.).

8.2 PTH-Identifizierung

8.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die PTH-Aminosäuren (5 - 10 nmol) wurden auf Kieselgelplatten aufgetragen und in 3 verschiedenen Systemen hintereinander entwickelt^(49,50).

System I: Propionsäure-tert.-Butylester

System II: 80% Äthylenchlorid

20% Eisessig

System III: 50% Methanol

38% Äthylenchlorid

10% Essigester

2% Eisessig

Platten: DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F 254

Schichtdicke: 0,25 mm

Die Identifizierung erfolgte mit UV-Licht (254 nm)

8.2.2 HPLC über Umkehrphase

Bei geringen Mengen an Peptid wurde der Nachweis mit 100 - 1000 pmol auf der Umkehrphase des HPLC's durchgeführt.

1. Stufengradientenelution

Gerät: Liquid Chromatograph 1084 B von Hewlett Packard

Säule: ODS-Hypersil, RP 18, (Shandon) 4,6 x 250 mm

Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 4,8

Puffer B: 100% Acetonitril

Stufengradienten: 0 min. 10% Puffer B

1 min. 20% Puffer B

5 min. 45% Puffer B

14 min. 70% Puffer B

19 min. 10% Puffer B

Flußrate: 1,2 ml/min

Temperatur: 62°C

Detektion: multichromatisches Licht

265 nm

330 nm für PTH von Ser und Thr

Durch Subtraktion der bei 330nm gemessenen
Extinktion von der bei 265 nm erhält man
negative Gipfel für Thr- und Ser-PTH.

2. Isokratische Elution

Geräte: Wisp 710B Waters

Pumpe 112 Beckman

UV Detector BT 3030 Biotronik

Säule: RP 18 siehe oben

Puffer: 1775 ml Acetonitril + 25 ml Dichloräthan
+ 0,01 M Natriumacetat auf 5 l, pH 5,2

Flußrate: 1,4 ml/min

Temperatur: 62°C

Detektion: 265 nm

IV. Ergebnisse

1. Das Hämoglobin des Andenkondors

1.1 Blutentnahme und Globingewinnung

Die Blutentnahme, das Herstellen der Hämoglobinlösung, die Hämolyse, die Titerbestimmung und die Hämabspaltung erfolgten nach den in III 1.1 - 1.5 beschriebenen Methoden.

1.2 Analytische Trennung der Komponenten

Unter den in III 2.1 genannten Bedingungen spaltete sich das Hämoglobin in zwei Banden auf, die zwei Komponenten entsprechen (siehe Abb. 1). Die breitere Bande stellt die Hauptkomponente Hb A dar, die schwächere die Nebenkomponekte Hb D.

1.3 Kettentrennungen

1.3.1 Analytisch mit Tritongeleelektrophorese

Die Tritongeleelektrophorese mit Globin oder nativem Hämoglobin brachte keine Unterschiede. Die Durchführung nach III 3.1 ergab 3 Banden. Die langsam laufende beta-Kette, dann die α^D - und die α^A -Kette (siehe Abb. 2). Die neben der α^A -Kette auftretende schwache Bande tritt in anderen Gelen nicht auf (s. Abb 3). Es handelt sich wahrscheinlich um ein Artefakt.

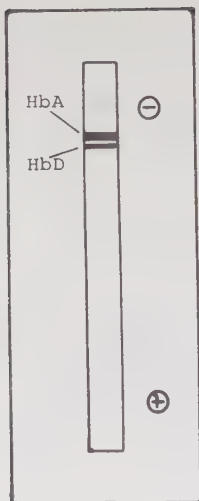


Abb. 1

Polyacrylamid-Gelelektrophorese
unter nativen Bedingungen
2 einheitliche Banden
Probe: 60 μg Hämoglobin

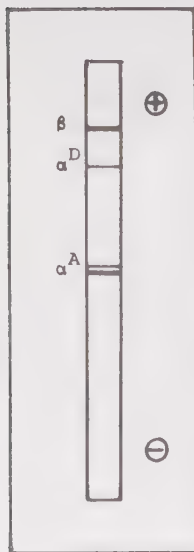


Abb. 2

Polyacrylamid-Gelelektrophorese
mit Triton X-100, unter denaturierenden
Bedingungen.
Die Banden der β - und α^D -Ketten sind
einheitlich, die der α^A -Ketten spalten
auf.
Probe: 40 μg Hämoglobin

1.3.2 Präparativ durch CM-Cellulose

Die Kettentrennung an CM-Cellulose (nach III 3.2) ergab drei Hauptgipfel. Als erste wurde die α^D -Kette eluiert, ihr folgte die α^A -Kette. Um diese beiden Ketten voneinander zu trennen, mußte der Gradient sehr flach sein. Durch den logarithmischen Gradienten A wurde schnell ein höheres Niveau an Salzkonzentration erreicht, das durch den linearen Gradienten B (mit großem Volumen) nur langsam erhöht wurde. Durch eine weitere Abflachung des Gradienten B wurde eine bessere Trennung der beiden alpha-Ketten erreicht (siehe Diagramm 1, 2, 3). Um die Gipfel der α^D - und α^A -Kette und zwischen beiden bildeten sich Nebengipfel. Durch Tritongeleelektrophorese wurde in den Nebengipfeln eine der beiden alpha-Ketten nachgewiesen (s. Abb.3).

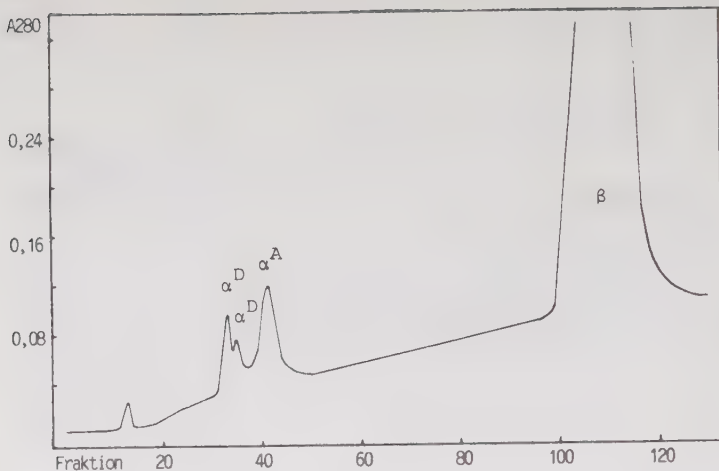


Diagramm 1

Kettentrennung des Kondorglobins über CM-Cellulose

Säule: 2,5 x 18 cm

Puffer: 50 mM Ammoniumacetat pH 5,4; 8 M Harnstoff

0,02% β -Mercaptoäthanol

Flußrate: 40 ml/h

Gradient: 200 ml 0,0 - 0,1 mM NaCl log.

600 ml 0,1 - 0,2 mM NaCl lin.

250 ml 0,2 - 0,5 mM NaCl log.

Probe: 60 mg in 20 ml Startpuffer

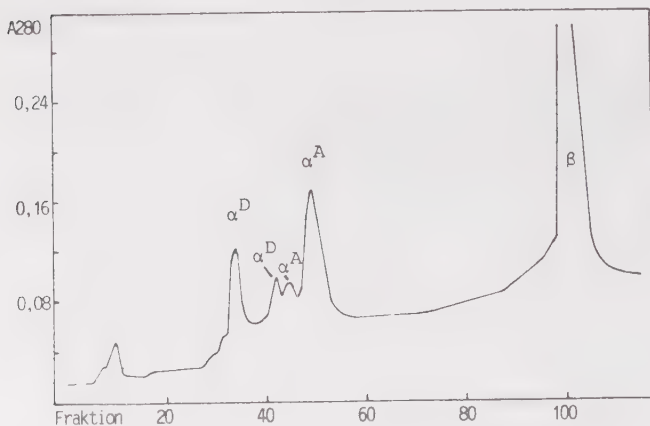


Diagramm 2

Kettentrennung des Kondorglobins über CM-Cellulose
wie Diagramm 1 jedoch

Gradient: 300 ml 0,0 - 0,1 mM NaCl log.

Probe: 110 mg in 20 ml Startpuffer

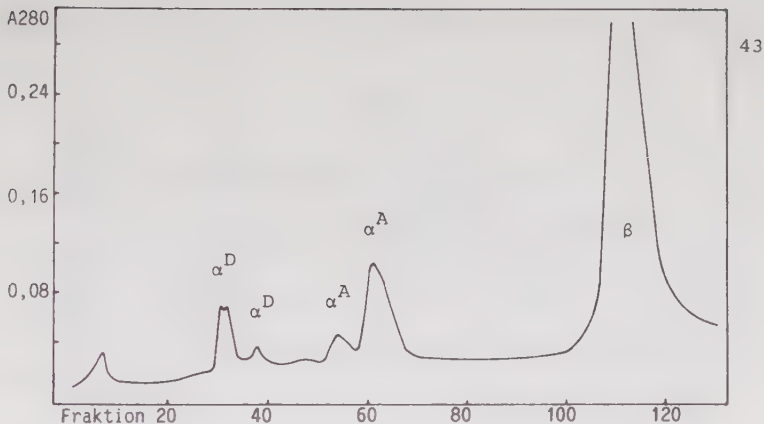
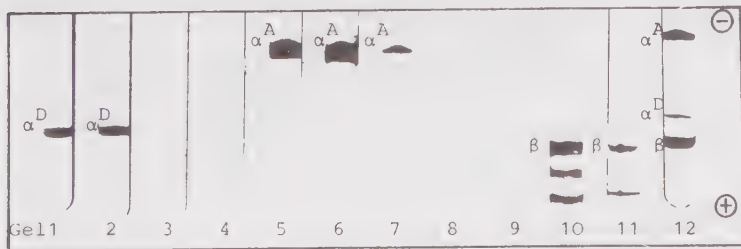


Diagramm 3

Kettentrennung des Kondorglobins
über CM-Cellulose
wie Diagramm 1
jedoch

Gradient: 300 ml 0,0 - 0,09 mM NaCl log.
600 ml 0,09 - 0,2 mM NaCl lin.
250 ml 0,2 - 0,5 mM NaCl log.

Probe: 150 mg in 20 ml Startpuffer



Gel = Fraktion

- 1 = 31
- 2 = 33
- 3 = 39
- 4 = 48
- 5 = 54
- 6 = 60
- 7 = 70
- 8 = 80
- 9 = 90
- 10 = 110
- 11 = 120
- 12 = Gesamtglobin

Abb. 3

Polyacrylamid-Gelelektrophorese
mit Triton X-100, unter denaturierenden
Bedingungen.

Überprüfung der Reinheit der Ketten aus
der Kettentrennung von Diagramm 3.

Probe: 70 μ l Eluat je Fraktion

1.4 Die Peptide der α^A -Ketten

Nach der Oxidation (III 4.1) wurden 650 nmol der α^A -Kette mit insgesamt 5% Trypsin gespalten (III 5.1). Bei dieser Spaltung wurden durch eine erhöhte Trypsinmenge und lange Einwirkungszeit (2 x 2 h) mehr unspezifische Spaltungen erhalten, jedoch konnte die Ausbeute der gespaltenen Core-Peptide Tpl2 und Tpl3 erhöht werden. Die Peptidtrennung auf RP-HPLC (III 6.2) zeigte, daß der Peak des Tp 12/13 (siehe Diagramm 4, 5 und 6) mit zunehmender Spaltzeit zugunsten der Peaks von Tp 12 und Tp 13 abgebaut wurde.

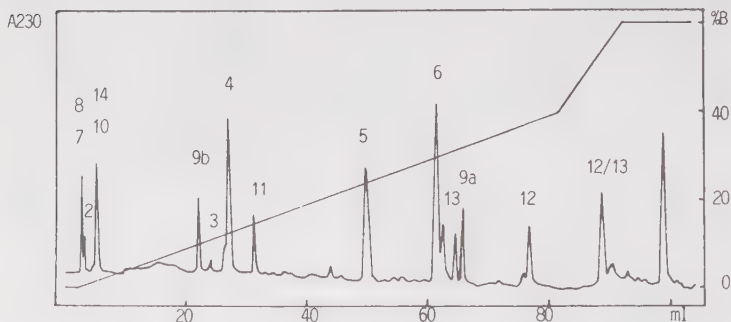


Diagramm 4

Trennung der tryptischen Peptide der α^A -Ketten mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm
 Lichrosorb, RP 2, 7 μ m
 Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat
 pH 6,0
 Puffer B: Acetonitril + 0,83% HAC
 Flußrate: 2 ml/min.
 Gradient: nach 1 min. 1%/min.
 Probe: 10 nmol in 30 μ l verd.
 HAC nach 2 h Spaltung
 mit 2% TPCK-Trypsin

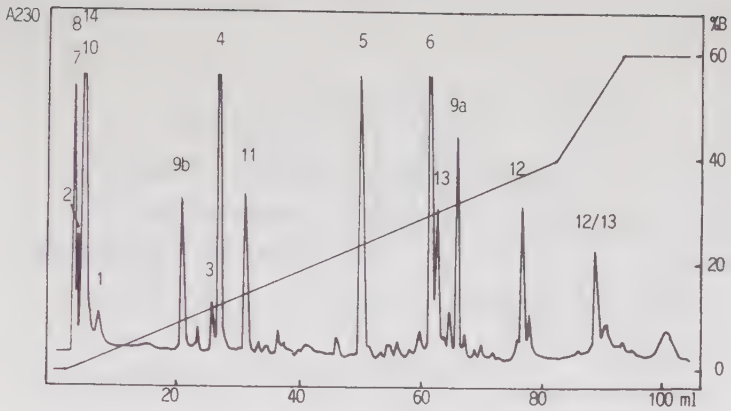


Diagramm 5

wie Diagramm 4
jedoch nach 3,5 h Spaltung mit
5% TPCK-Trypsin

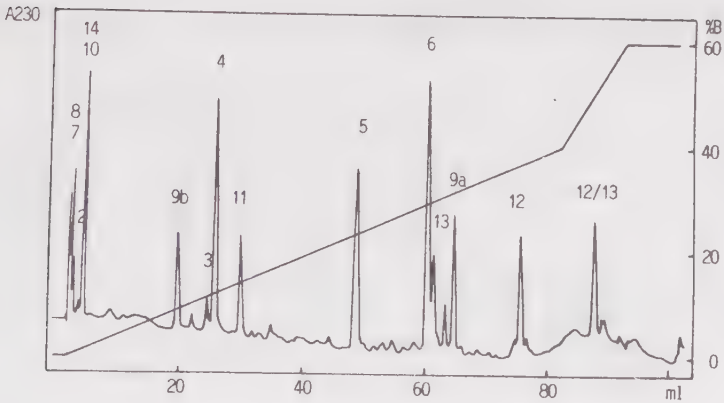


Diagramm 6

wie Diagramm 4
jedoch nach 4 h Spaltung mit
5% TPCK-Trypsin
Probe: ca. 30 nmol in 100 μ l verd. HAC

1.4.1 Aminosäureanalyse und Sequenzanalyse

Nach Hydrolyse und Aminosäureanalyse (III. 7) (siehe Tab. I) wurden die Ketten (42 Schritte) und die tryptischen Peptide vollständig im automatischen Sequenator analysiert. Durch homologe Zuordnung zu den Globinen der Graugans erübrigte sich eine überlappende Spaltung (s. Tab. IV).

Zusammenstellung der analysierten Peptide der α^A -Ketten des Andenkondors:

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61	Tp9a 62-82
P	x					x	x		x
Q									
I						x			
IV									
Pb							x		x
K	x	x	x	x	x				
A								x	

Pos.	Tp9b 83-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140+141
P	x			x		
Q			x		x	
I	x					
IV			x		x	
K						
A		x				x

P = "Propinprogramm" Q = "Quadrolprogramm"
 I = Peptid mit Reagenz I umgesetzt
 IV = Peptid mit Reagenz IV umgesetzt
 Pb = Polybren
 K = Sequenz des Peptids durch Kettensequenzanalyse
 A = Sequenz des Peptids durch Aminosäureanalyse

1.5 Die Peptide der α^D -Ketten

Die oxidierte α^D -Kette (500nmol) wurde 1 h bei pH 11 mit 1,1% Trypsin gespalten und 1 h bei pH 8,8 mit der gleichen Menge Trypsin (s. III 4.1 u. 5.1). Das tryptische Hydrolysat wurde über RP-2 auf HPLC im Ammoniumacetatsystem (III 6.2) getrennt. Von den rein eluierten Peptiden Tp 1/2a, 5, 6, 8/9a, 9a, 9b/10 wurden Aminosäureanalysen und Sequenzanalysen durchgeführt (s. Diagramm 7). Die Sequenz der Peptide 2b/3 und 4 wurde über die Sequenzierung der Kette bis Position 42 erhalten, die jedoch nur bis einschließlich Tp 4 eindeutig war. Tp 7 und Tp 14 konnten durch präparative DC-Elektrophorese (s. III 3.2) aus den ersten Gipfeln der RP-2-HPLC-Läufe isoliert werden (s. Diagramm 7 u. Abb.4).

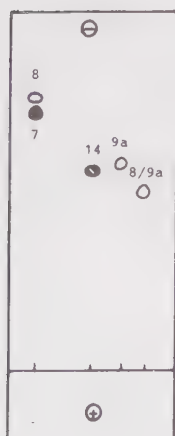


Abb. 4

Trennung von Tp 7 und 8 von Tp 14 und Reinheitsprüfung der tryptischen Peptide 8/9a und 9a der α^D -Kette mittels Dünnschichtelektrophorese

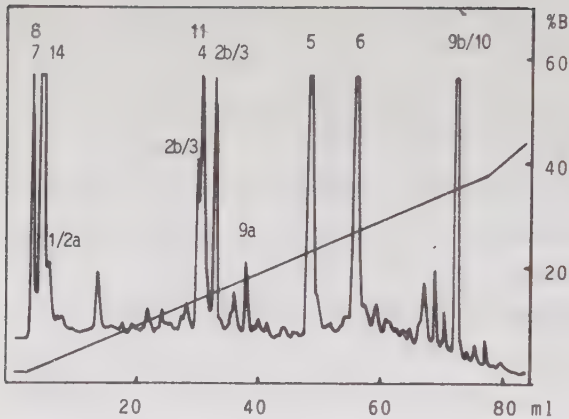


Diagramm 7

Trennung der tryptischen Peptide der α -Ketten mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm
 Lichrosorb, RP 2, 7 μ m
 Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat
 pH 6,0
 Puffer B: Acetonitril + 0,83% HAC
 Flußrate: 2 ml/min.
 Gradient: nach 1 min. 1 %/min.
 nach 39 min. 2,2%/min.
 Probe: 60 nmol in 100 μ l verd.
 HAC nach 105 min. Spaltung mit 2,2% TPCK-Trypsin

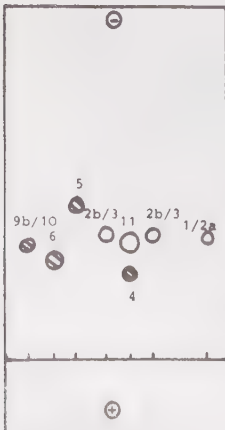


Abb. 5

Dünnschichtelektrophorese zur Trennung der tryptischen Peptide 4 und 11 der α -Kette
 Reinheitsprüfung von Tp 1/2a, 2b/3, 5, 6, 9b/10.

Die zur Aminosäureanalyse der Peptide 2b/3, 4 und 11 nötige Menge wurde aus einer präparativen DC-Elektrophorese und aus RP-2-HPLC-Läufen (s. III 6.2) über Vydak^R RP 18 (Diagramm 8 und 9) erhalten. Auf der DC-Elektrophorese trennte sich das Peptid Tp 4 ab (Abb.5). Ein nur unwesentlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit zwischen Tp 2b/3 und Tp 11 ermöglichte keine Trennung der beiden Peptide. Dieses Peptidgemisch (Diagramm 7) und alle drei Peptide wurden über Vydak^R Rp 18 auf HPLC, wie in III 6.2 beschrieben getrennt (Diagramm 8 u 9).

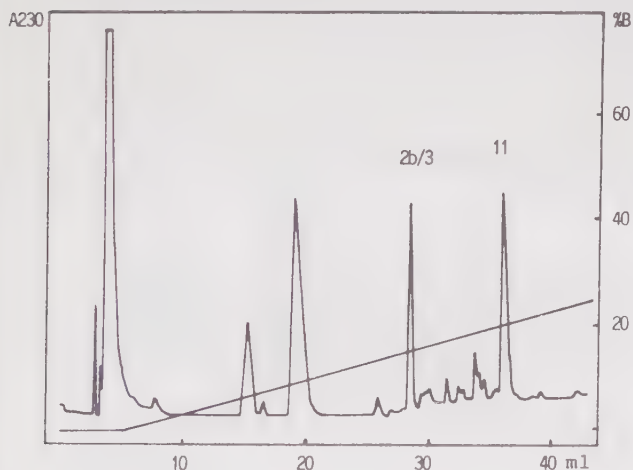


Diagramm 8

Trennung der tryptischen Peptide 2b/3 und 11 nach Abtrennung des Tp 4 mittels Dünnschichtelektrophorese.

Säule: 4,6 x 250 mm
 Vydak, RP 18, 10 μ m
 Puffer A: 0,1% TFA
 Puffer B: Acetonitril + 0,1% TFA
 Flußrate: 1 ml/min.
 Gradient: nach 1 min. 1%/min.
 Probe: 10 nmol in 140 μ l verd. HAC

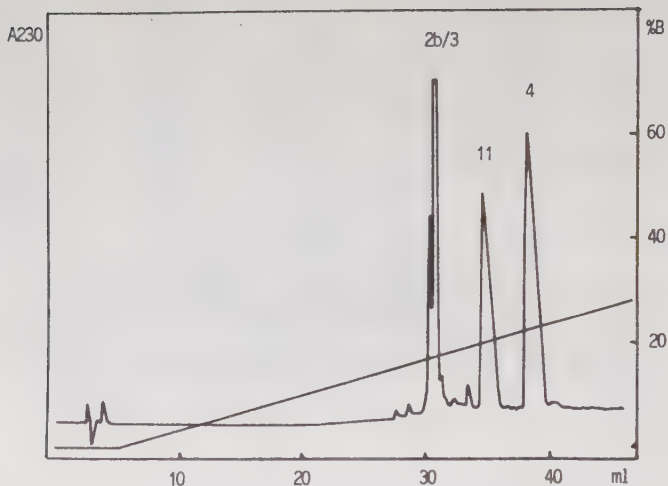


Diagramm 9

Trennung der tryptischen Peptide 2b/3, 4 und 11
 Bedingungen wie Diagramm 8
 Probe: 20 nmol in verd. HAC

Die Dünnschichtelektrophorese und die Trennung auf RP-2 erbrachte keine Hinweise auf Tp 12 und Tp 13. Ein neuer Spaltansatz mit 6% Trypsin bei pH 11 wurde durch HPLC über eine LiChrosorb RP-2 Säule getrennt (Diagramm 9). Aufgrund der bisher gefundenen Homologien zwischen Sequenzen anderer Vögel wurde angenommen, daß Tp 13 in den hinteren kleinen Peaks zu suchen war. Die Isolierung von Tpl2 und Tpl3 der α^D -Ketten gelang nicht sofort. Erst in einem zweiten Ansatz (Spaltung mit 10% Trypsin bei pH 11) konnten diese Peptide mit HPLC über Vydak^R RP 18 gewonnen werden (Diagramm 10).

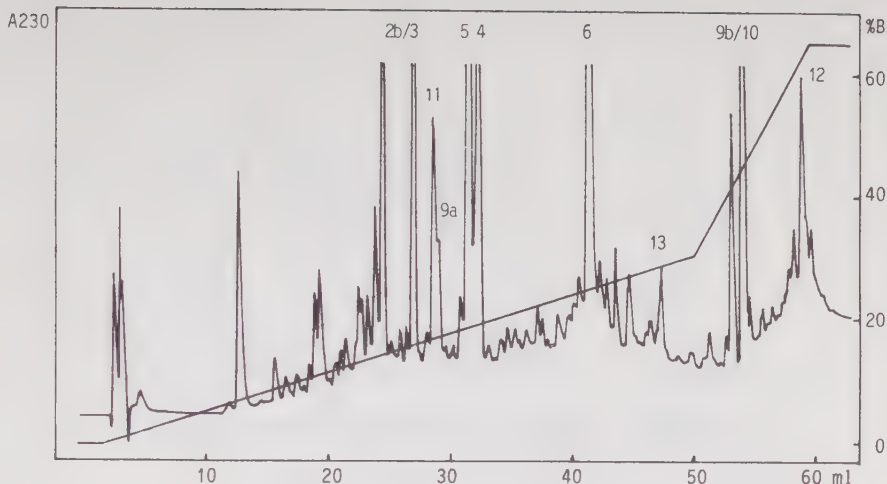


Diagramm 10

Trennung der tryptischen Peptide der α^D -Kette mittels HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm
Vydak, RP 18, 10 μ m

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: Acetonitril + 0,1% TFA

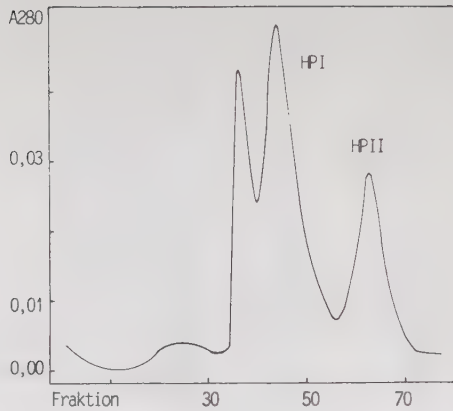
Flußrate: 1 ml/min.

Gradient: nach 2 min. 0 - 40% B in 60 min.

nach 50 min. 65% B in 10 min.

Probe: 80 nmol in 100 μ l verd. HAC

Durch hydrolytische Spaltung der Asp/Pro-Bindung und Isolierung des C-terminalen hydrolytischen Peptids von Position 95 - 141 (Diagramm 11), wie in III 5.2 beschrieben, konnte die Sequenz des Tp 12 ermittelt werden. Lediglich Position 115 war nicht eindeutig als Alanin zu bestimmen. Dazu war es notwendig, Tp 12 zu isolieren. Die Summenformeln der tryptischen Peptide sind in Tab. II wiedergegeben. Tabelle V zeigt die Primärstruktur.



52

Diagramm 11

Trennung des säurehydrolytischen Peptidgemisches
nativer α^D -Ketten

Säule: 2,5 x 200 cm, Sephadex G 50 fine

Puffer A: 10% Ameisensäure, 8 M Harnstoff

Flußrate: 18 ml/h

Fraktionen: 5,3 ml/20 min.

Zusammenstellung der analysierten Peptide der α^D -Ketten
des Andenkondors:

	Tp1	2a	Tp2b/3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9a
Pos.	1-7	8	9-16	17-31	32-40	41-56	57-60	61	62-71
P						x			
Q					x		x		x
I									
IV					x				x
Pb							x		
K	x	x	x	x					
A								x	

	Tp9b/10	Tp11	Tp12	Tp13	Tp14	Asp/Pro	Kette
Pos.	72-92	93-99	100-127	128-139	140-141	95-141	1-141
P	x		x			x	
Q		x		x			x
I							
IV		x		x			
Pb			x				
K							
A					x		

P = "Propinprogramm" Q = "Quadrolprogramm"

I = Peptid mit Reagenz I umgesetzt

IV = Peptid mit Reagenz IV umgesetzt

Pb = Polybren

K = Sequenz des Peptids durch Kettensequenzanalyse

A = Sequenz des Peptids durch Aminosäureanalyse

1.6 Die Peptide der beta-Ketten

19 mg (ca. 1,3 μmol .) der nach III 4.1. oxidierten beta-Ketten wurden mit TPCK-Trypsin verdaut (III.5.1.). Die löslichen Peptide wurden über RP-2 LiChrosorb mit HPLC voneinander getrennt. Es konnten Tp 4, 9a, 9b, 10, 11, 14a, 14b, rein isoliert werden. (s. Diagramm 12 und Abb. 6) Peptide, die in den Anfangspeak enthalten waren, wurden über Vydak^R RP-18 rechromatographiert (s. Diagramm 13 und Abb. 7). Die Peptide Tp 7, Tp8 und Tp 14c/15 konnten dadurch gewonnen werden.

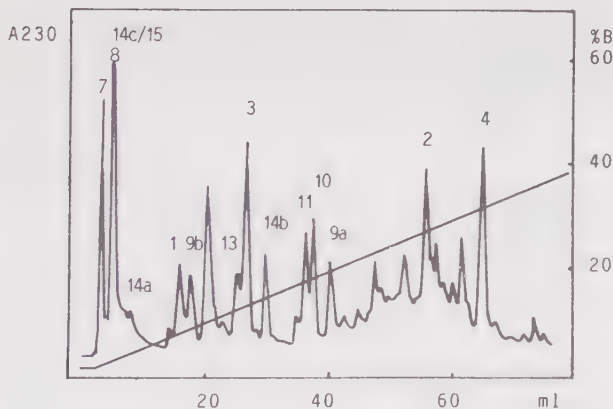


Diagramm 12

Trennung der tryptischen Peptide der β -Ketten mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm
LiChrosorb, RP 2, 7 μm
Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat
pH 6,0
Puffer B: Acetonitril + 0,83% HAC
Flußrate: 2 ml/min.
Gradient: nach 1 min. 1%/min.
Probe: 60 nmol in 100 μl verd.
HAC

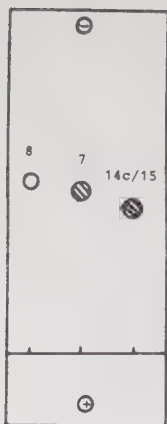


Abb. 6



Abb. 7

Dünnschichtelektrophorese tryptischer
Peptide der β -Ketten

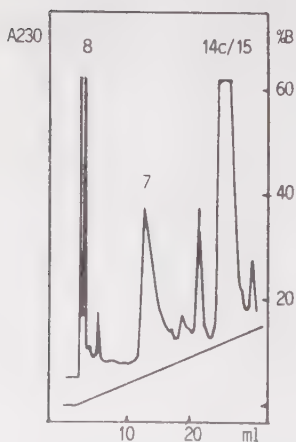


Diagramm 13

Rechromatographie der früh eluierten
tryptischen Peptide. (Tp 7, 8, 14c/15)

Säule: 4,6 x 250 mm
Vydak, RP 18, 10 μ m

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: Acetonitril + 0,1% TFA

Flußrate: 2 ml/min.

Gradient: nach 1 min. 1%/min.

Probe: 20 nmol in 95 μ l verd.
HAC

Tp 5/6 befand sich bei pH 4 im Core-Anteil der tryptischen Spaltung. Der Core-Anteil wurde durch Zentrifugation isoliert, in konzentriertem Ammoniak gelöst und anschließend 10:1 mit Wasser verdünnt. Die Reinigung erfolgte über RP-2 LiChrosorb auf HPLC (Diagr. 14).

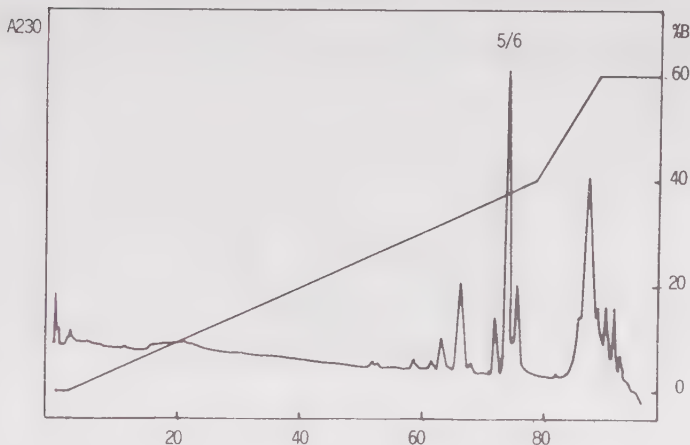


Diagramm 14

Reinigung des Tp 5/6 mit HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm
 LiChrosorb, RP 2, 7 μ m
 Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat
 pH 6,0
 Puffer B: Acetonitril + 0,83% HAC
 Flußrate: 2 ml/min.
 Gradient: nach 1 min. 1 %/min.
 nach 39 min. 4,4%/min.
 nach 44 min. 0 %/min.

Probe: 20 nmol in 10 μ l verd.
 HAC

Durch Rechromatographie einer Fraktion der RP-2 Chromatographie über Vydak^R RP-18 mit HPLC (0,1%iger TFA) gelang die Reinigung des Peptids Tp13 (s. Diagr. 15). Die unter diesen Bedingungen bekannte Elutionszeit (nach 25 min.) erlaubte es, eine ausreichende Menge des Tp 13 über die Trennung des tryptischen Gesamthydrolysats zu gewinnen. (s. Diagr. 16)

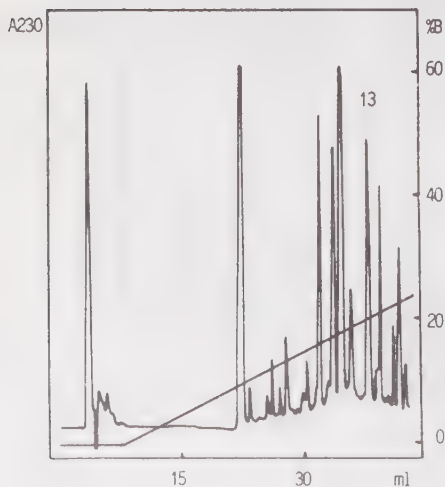
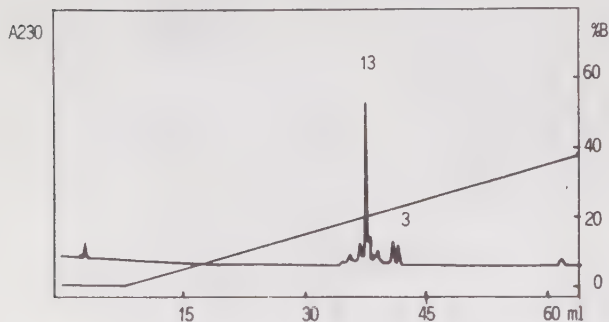


Diagramm 15(oben)

Rechromatographie des Tp 13 und

Diagramm 16(unten)

Trennung tryptischer Peptide
der β -Ketten

Säule:	4,6 x 250 mm
	Vydak, RP 18, 10 μ m
Puffer A:	0,1% TFA
Puffer B:	Acetonitril + 0,1% TFA
Flußrate:	1,5 ml/min.
Gradient:	nach 5 min. 1%/min.
Probe 15:	2 nmol in 60 μ l
Probe 16:	25 nmol in 10 μ l
	verd. HAC

1.6.1 Hydrolytische Spaltung der Asp/Pro-Bindung und Peptidisolierung

Die Sequenz des fehlenden Tp 12 (Pos. 105-120) wurde über das C-terminale hydrolytische Peptid Hp II (Pos. 100-146) ermittelt. 15 mg (ca. 1 μ mol) native Ketten wurden wie in III. 5.2. beschrieben gespalten, getrennt und entsalzt. Das Diagramm 17 zeigt das Elutionsprofil der Peptidtrennung über Sephadex G-50 fine.

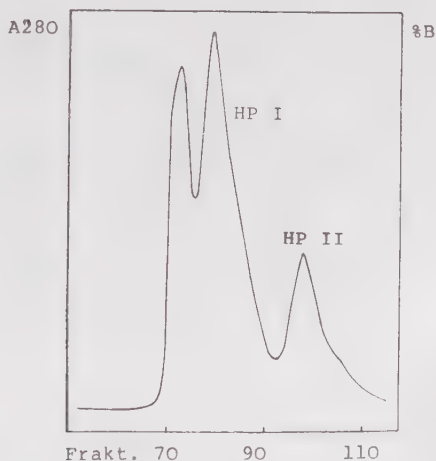


Diagramm 17

Trennung des säurehydrolytischen Peptidgemisches
nativer β -Ketten

Säule: 2,5 x 200 cm, Sephadex G 50 fine
Puffer A: 10% Ameisensäure, 8 M Harnstoff
Flußrate: 20 ml/h
Fraktionen: 5 ml/15 min.
Probe: ca. 900 nmol

1.6.2 Gelchromatographie

Die Vorfraktionierung mit Gelchromatographie erlaubte eine bessere Reinigung der Peptide über Vydak^R Rp-18 mit HPLC. Wie aus Diagramm 19 zu sehen ist, waren in den Fraktionen 82 - 86 der Gelchromatographie (s. Diagr. 18) nur 3 Peptide in größeren Mengen vorhanden (Tp 9a, 10, 14b).

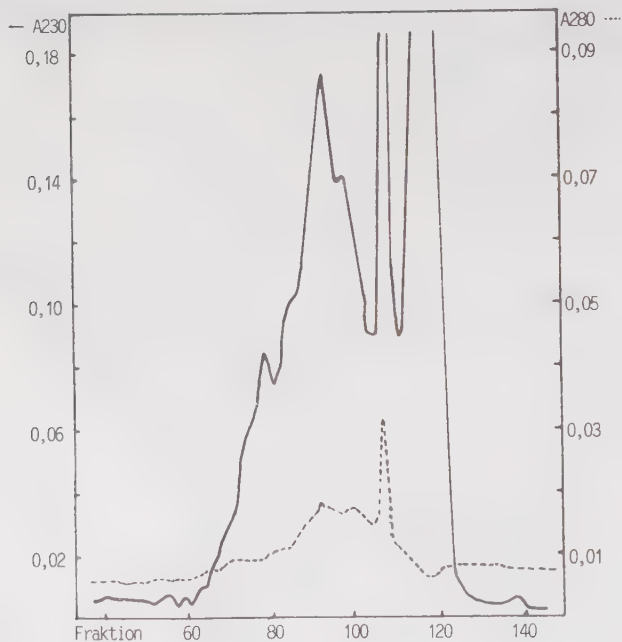


Diagramm 18

Gelfiltration der löslichen tryptischen Peptide
der β -Ketten

Säule: 2,5 x 220 cm
Sephadex G 25 fine
Puffer: 0,1 N Essigsäure
Flußrate: 21 ml/h
Fraktionen: 7 ml/20 min.
Probe: ca. 900 nmol

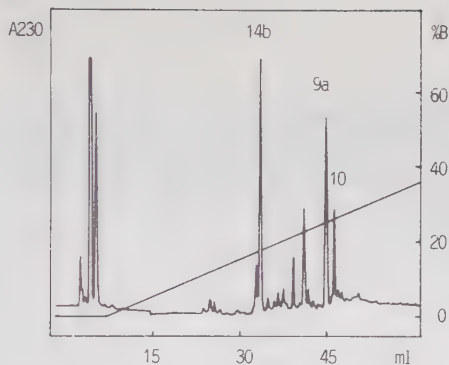


Diagramm 19

Rechromatographie der Sephadex-Fractionen
82 - 86 mittels HPLC
Bedingungen wie Diagramm 15

Zusammenstellung der analysierten Peptide der beta-Ketten
des Andenkondors:

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5/6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b
Pos.	1-8	9-17	18-30	31-40	41-61	62-65	66	67-76	77-82
P					x				
Q						x		x	x
I									
IV								x	x
Pb						x			
K	x	x	x	x					
A							x		

	Tp10	Tp11	Tp13	14a	14b	14c+15	Asp/Pro	beta-Kette
Pos.	83-95	96-104	121-132	133-135	136-143	144-146	100-146	1-146
P		x	x		x	x	x	
Q	x							
I			x					x
IV								
Pb						x		
K								
A				x				

P = "Propinprogramm" Q = "Quadrolprogramm"
 I = Peptid mit Reagenz I umgesetzt
 IV = Peptid mit Reagenz IV umgesetzt
 Pb = Polybren
 K = Sequenz des Peptids durch Kettensequenzanalyse
 A = Sequenz des Peptids durch Aminosäureanalyse

Tabelle I

Analysen der tryptischen Peptide der alpha^A-Ketten des Kondors (Teil 1)

	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b
Pos.	1-7	8-11	12-16	17-31	32-40	41-56	57-60	61	62-82	83-90
Asx	1.02	0.94	-	1.01	-	0.91	-	-	2.94	1.15
Thr	-	1.04	-	0.83	1.69(2)	0.67	-	-	-	-
Ser	1.72	-	-	-	-	0.99	-	-	1.73(2)	0.95
Glx	-	-	-	3.33(3)	1.19	1.49(2)	-	-	1.15	1.12
Pro	-	-	-	-	0.93	0.98	-	-	-	-
Gly	1.11	-	1.07	2.93	-	1.13	1.89	-	1.13	-
Ala	-	-	0.97	2.17	-	0.93	-	-	4.86	0.96
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	0.95	0.91	1.04	-	-	-	-	-	1.15(2)	-
Met	-	-	-	-	1.02	-	-	-	-	-
Ile	-	-	-	1.03	1.08	0.88	-	-	2.77	1.92
Leu	1.04	-	2.02	1.08	-	1.09	-	-	2.06	-
Tyr	-	-	-	0.88	1.12	1.33(1)	-	-	-	-
Phe	0.93	-	0.92	-	1.01	1.81	-	-	-	-
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	1.16	1.06	1.00	-	0.96	1.09	1.08	1.00	0.99	0.98
His	-	-	-	0.91	-	2.69(2)	1.03	-	1.21	0.93
Arg	-	-	-	0.83	-	-	-	-	-	-
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8

Analysen der tryptischen Peptide der alpha^A-Ketten des Kondors (Teil 2)

	Tp10	Tp11	Tp12	Tp13	Tp14+Tp10	Summe	Globin
Pos.	91-92	93-99	100-127	128-139	91-92+ 140-141	1-141	1-141
Asx	-	1.99	1.42(1)	0.95	-	12	11.85 (12)
Thr	-	-	0.75	0.86	-	7	7.00 (7)
Ser	-	-	2.03	-	-	8	7.48 (8)
Glx	-	-	2.18	-	-	10	10.21 (10)
Pro	-	0.99	1.76	-	-	5	5.52 (5)
Gly	-	-	3.34(3)	1.03	-	11	11.05 (11)
Ala	-	-	2.54(3)	1.68(2)	-	14	13.90 (14)
Cys	-	-	0.91	0.81	-	2	2.03 (2) *
Val	-	1.95	3.77	2.81	-	14	14.00 (14) *
Met	-	-	-	-	-	1	1.35 (1)
Ile	-	-	0.81	-	-	7	6.77 (7) *
Leu	1.13	-	4.41(4)	1.72(2)	1.07	15	15.32 (15)
Tyr	-	-	-	-	0.90	4	4.19 (4)
Phe	-	0.98	1.01	1.02	-	7	6.94 (7)
Trp	-	-	-	-	-	-	-
Lys	-	1.08	0.85	1.10	-	12	12.12 (12)
His	-	-	2.20	-	-	9	9.01 (9)
Arg	0.87	-	-	-	1.92	3	3.31 (3)
Summe	2	7	28	12	4	141	(141)

* Werte aus der 200 Stunden Analyse entnommen

Tabelle II

 Analysen der tryptischen Peptide der alpha^D-Ketten des Kondors
 (Teil 1)

Pos.	Tp1+Tp2a 1-7+8	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7+Tp8 57-60+61	Tp9a 62-71
Asx	1.99(2)	-	1.09(1)	-	2.00(2)	-	1.18(1)
Thr	0.97(1)	0.94(1)	-	1.01(1)	0.95(1)	-	-
Ser	-	-	-	0.96(1)	1.72(2)	0.78(1)	-
Glx	-	2.98(3)	3.87(4)	1.17(1)	1.27(1)	-	-
Pro	-	-	-	1.03(1)	1.09(1)	-	-
Gly	-	-	2.00(2)	-	1.26(1)	1.15(1)	1.24(1)
Ala	0.99(1)	-	1.97(2)	-	-	-	3.02(3)
Cys	-	-	-	-	0.91(1)	-	-
Val	-	-	1.08(1)	-	-	-	2.02(2)
Met	0.80(1)	-	0.75(1)	0.83(1)	-	-	-
Ile	-	0.88(1)	-	0.99(1)	0.99(1)	-	-
Leu	1.43(1)	1.01(1)	1.02(1)	-	1.23(1)	-	1.46(1)
Tyr	-	-	-	0.91(1)	0.60(1)	-	-
Phe	-	-	1.03(1)	1.03(1)	1.80(2)	-	-
Trp	-	0.64(1)	-	-	-	-	-
Lys	1.82(2)	1.19(1)	-	1.08(1)	-	2.01(2)	1.08(1)
His	-	-	0.98(1)	-	1.28(1)	1.07(1)	-
Arg	-	-	0.87(1)	-	0.90(1)	-	-
Summe	8	8	15	9	16	4 + 1	10

 Analysen der tryptischen Peptide der alpha^D-Ketten des Kondors
 (Teil 2)

Pos.	Tp9b/10 72-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Summe 1-141	Ketten 1-141
Asx	3.91(4)	2.08(2)	-(1)	-	-	13	13.11 (13)
Thr	-	-	-(1)	-	-	5	5.22 (5)
Ser	3.78(4)	-	-(1)	1.23(1)	-	10	9.56 (10)
Glx	2.12(2)	-	-(3)	1.18(1)	-	16	16.44 (16)
Pro	-	1.02(1)	-(1)	-	-	4	5.85 (5)
Gly	-	-	-(1)	-	-	6	5.92 (6)
Ala	1.88(2)	-	-(4)	2.21(4)	-	16	15.16 (16)
Cys	-	-	-(1)	-	-	2	2.15 (2) (ox)
Val	-	1.85(2)	-(4)	1.16(2)	-	13	12.51 (13) *
Met	-	-	-	-	-	2	1.58 (2) (ox)
Ile	-	-	-	-	-	3	3.32 (3)
Leu	6.71(6)	-	-(4)	1.85(2)	-	17	16.11 (17)
Tyr	1.08(1)	-	-(1)	-	0.90(1)	5	3.70 (5)
Phe	-	1.02(1)	-(2)	1.35(1)	-	8	6.95 (8)
Trp	-	-	-	-	-	1	0.50 (1) (Trp)
Lys	-	1.03(1)	-(1)	1.02(1)	-	10	10.08 (10)
His	1.07(1)	-	-(2)	-	-	6	5.33 (6)
Arg	0.88(1)	-	-	-	1.10(1)	4	3.48 (4)
Summe	21	7	28	12	2	141	(141)

(ox) - Werte aus der Analyse von oxidiertem Kette entnommen

(Trp) Werte aus der Analyse mit Thioglykolsäure versetzter Kette entnommen

* Werte aus der 200 Stunden Analyse entnommen

Tabelle III

Analysen der tryptischen Peptide der beta-Ketten des Kondors (Teil 1)

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5/6 41-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76	Tp9b 77-82
Asx	-	-	1.23	-	2.05	-	-	-	3.52(3)
Thr	-	0.99	-	1.08	1.05	-	-	1.04	-
Ser	0.87	-	-	-	2.88	-	-	1.04	-
Glx	2.07	1.48(1)	2.21	1.20	-	-	-	1.03	-
Pro	-	-	-	0.92	2.02	-	-	-	-
Gly	-	1.61(2)	1.01	-	2.12	1.15	-	1.01	-
Ala	1.19	-	3.57(4)	-	2.06	0.96	-	1.01	-
Cys	-	-	1.05	-	-	-	-	-	-
Val	0.69	-	1.92	0.79	0.88	-	-	1.92	-
Met	-	-	-	-	0.84	-	-	-	-
Ile	-	0.86	-	0.81	1.06(2)*	-	-	-	0.76
Leu	-	2.07	1.11	2.19	1.17	-	-	1.05	0.89
Tyr	-	-	-	0.98	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	2.90	-	-	0.95	-
Trp	(1)	0.45(1)	-	0.68(1)	-	-	-	-	-
Lys	1.09	1.02	-	-	-	0.97	1.00	1.13	0.88
His	1.22	-	-	-	-	0.96	-	-	-
Arg	-	-	0.89	1.00	0.97	-	-	-	-
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6

* In diesem Peptid liegt eine Ile-Ile-Bindung vor, die bei der 20 h Hydrolyse nicht spaltete.

Analysen der tryptischen Peptide der beta-Ketten des Kondors (Teil 2)

Pos.	Tp10 83-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14a 133-135	Tp14b 136-143	Tp14c+15 144-146	Summe 1-146	Ketten 1-146
Asx	1.12	1.84	(1)	1.73(2)	-	-	-	12 12.59	(12)
Thr	1.02	-	-	0.89	-	-	-	6 5.92	(6)
Ser	1.05	-	-	-	-	-	-	6 5.79	(6)
Glx	2.83	1.22	-	2.52(2)	-	-	-	13 13.26	(13)
Pro	-	0.92	-	0.56(1)	-	-	-	5 5.55	(5)
Gly	-	-	(1)	-	-	-	-	8 8.39	(8)
Ala	1.07	-	(3)	2.04	-	3.77	-	19 19.36	(19)
Cys	0.91	-	-	1.01	-	-	-	3 3.28	(3) (ox)
Val	-	1.05	(1)	-	0.98	1.23	-	11 11.06	(11) *
Met	-	-	-	-	-	-	-	1 0.78	(1)
Ile	-	-	(3)	-	-	-	-	8 7.26	(8) *
Leu	1.99	1.11	(4)	-	1.06	1.00	-	17 17.20	(17) *
Tyr	-	-	-	-	-	-	0.89	2 2.95	(2)
Phe	0.97	0.93	(1)	0.90	-	-	-	8 7.99	(8)
Trp	-	-	-	1.14	-	-	-	4 3.01	(4) (Trp)
Lys	1.04	-	(1)	1.26(1)	-	-	1.06	10 10.10	(10)
His	1.01	0.99	(1)	-	-	0.95	1.05	7 7.25	(7)
Arg	-	0.94	-	-	0.97	0.91	-	6 5.65	(6)
Summe	13	9	16	12	3	8	1 + 2	146	(146)

(ox) Werte aus der Analyse von oxidiertter Kette entnommen

(Trp) Werte aus der Analyse mit Thioglykolsäure versetzter Kette entnommen

* Werte aus der 200 Stunden Analyse entnommen

GG α Kondor α GG B	NA 1 Val - Val-His- 1 NA	A Ala-Ala 10 Ser	AB 20 Asp	B 20 Asp	30 Glu Thr-Leu-Glu- Ala-Ala-Val- Glu-Asp-Tyr-Gly-Ala-Glu- Gly-His-Ala-Glu-Asp-Tyr-Gly-Ala-Glu- Cys-Gly-Ala-Glu- 29
GG α Kondor α GG B	31 Arg-Met-Phe-Ile-Thr-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe - 30 Arg-Leu-(Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Irp-Thr-Gln-Arg-Phe-Phe-Ala-Ser-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-Ser-Pro-Thr-Ala-Ile-Ile-Gly-Asn-Pro-Met-Val- 30	C Thr-Ala 40 CD	49 Asp-Leu-Gln-His - 50 D	E Leu E	55 Gly-Ser-Ala-Gln-Ile- 60 E
GG α Kondor α GG B	Ala Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ile-Gly-Ala-Leu-Ile-Glu-Ala-Ala-Asn-His-Ile-Asp-Asp-Ile-Ala-Ala-Ser-Leu-Ser-Lys-Leu-Ser-Asp-Leu- 61 Arg-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Thr-Ser-Phe-Gly-Glu-Ala-Val-Lys-Asn-Leu-Asp-Asn-Ile-Lys-Asn-Thr-Phe-Ala-Gln-Leu-Ser-Glu-Leu- 70	Ala-Ala Val Val Asp 70 EF	80 Val Asp 80 EF	F Gly-Ala 80 F	90 Leu-Ser-Asp-Leu- 90
GG α Kondor α GG B	FG His-Ala-Gln-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Gly-Gln-Gly-Asn-His-Ile-Ile-His-His-Pro-Ser-Val-Leu- His-Cys-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asp-Ile-Leu-Ile-Val-Leu-Ala-Ala-His-Phe-Ala-Lys-Asp-Phe- Asp FG 100 G	90 Phe 101 His 110 G	GH 110 GH	Ala 120 Glu	GH
GG α Kondor α GG B	H Thr-Pro-Glu-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-Cys-Ala-Val-Gly-Asn-Val-Leu-Thr-Ala-Lys-Tyr-Arg Thr-Pro-Asp-Cys-Gln-Ala-Ala-Trp-Gln-Lys-Leu-Val-Arg-Ala-Val-Ala-His-Ala-Leu-Ala-Arg-Lys-Tyr-His Glu H	120 130 130 140 140 HC	140 140 140 140 140 HC	140 140 140 140 140 HC	140 140 140 140 140 HC

Tabelle IV

Aminosäuresequenz der α - und β -Ketten der Hämoglobinhauptkomponente (HbA) des Andenkondors (Vultur gryphus) in homologen Vergleich mit den α - und β -Ketten der Graugans (Anser anser). Die Balken A, B usw. kennzeichnen helikale Bereiche.

Fasun Konfor	α_D α	NA 1	A Met-Leu-Thr-Ala-Asp-Lys-Lys-Leu-Ile-Gln-Gln-Thr-Irp-Glu-Lys-Val-Val-Gly-His-Gln-Glu-Asp-Phe-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Gln-Val	AB 10	B Ala-Ala-Ser	Gln-Glu	Val	30
Fasun Konfor	α_D α	31	C Thr-Ala	CD 40	E Pro	Gly		60
Fasun Konfor	α_D α	61	D Leu-Gly	EF 70	F Met		FG	90
Fasun Konfor	α_D α	91	G Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-Gln-Cys-Phe-Gln-Val-Ile-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Asn-Leu-His-Ala-Tyr-Asn-				H	120
Fasun Konfor	α_D α	121	HC Val-His-Ala-Ala-Phe-Asp-Lys-Phe-Leu-Ser-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Glu-Lys-Tyr-Arg					140

Tabelle V

Aminosäuresequenz der α_D -Ketten der Hämoglobinnebenkomponente (HbD) des Andenkondors (Vultur gryphus) in homologem Vergleich mit den α -Ketten des Fasans (Phasianus colchicus colchicus).

Die Balken A, B usw. kennzeichnen helikale Bereiche.

2. Hämoglobine verschiedener Hühner

Blut wurde (wie in III.1. beschrieben) von adulten Leghorn A (*Gallus gallus*, L., 1758⁽⁹⁶⁾), Rhodeländer (*Gallus gallus*⁽⁹⁶⁾) und dem Sonnerathuhn (*Gallus sonneratii*, Temmink, 1813⁽⁹⁶⁾) abgenommen.

2.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese des Hämolysates (siehe III. 2.1) ergab 2 Banden, entsprechend der Hauptkomponente HbA (obere Bande) und der Nebenkomponekte HbD (untere Bande s. Abb. 8).

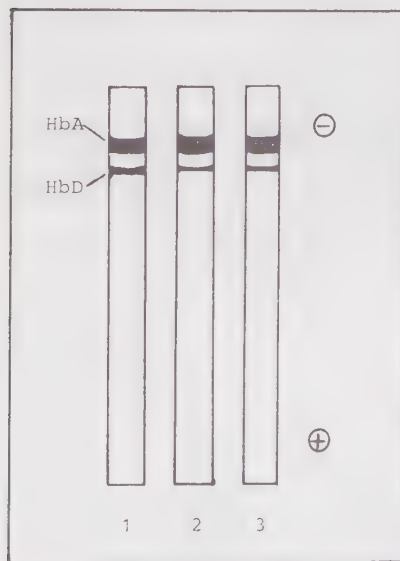


Abb. 8

Polyacrylamid-Gelelektrophorese
unter nativen Bedingungen
2 einheitliche Banden
Probe: 60 µg Hämoglobin

- 1 = Leghorn A
- 2 = Rhodeländer
- 3 = Sonnerathuhn

2.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit Triton

Die denaturierende Elektrophorese mit Triton (in III. 3.1. beschrieben) des Hämolysates lieferte vier Banden (Abb 9) Die α^A -Ketten wanderten am weitesten in Richtung Anode. Die beiden Banden im mittleren Bereich entsprechen den α^D -Ketten und die oberste den beta-Ketten.

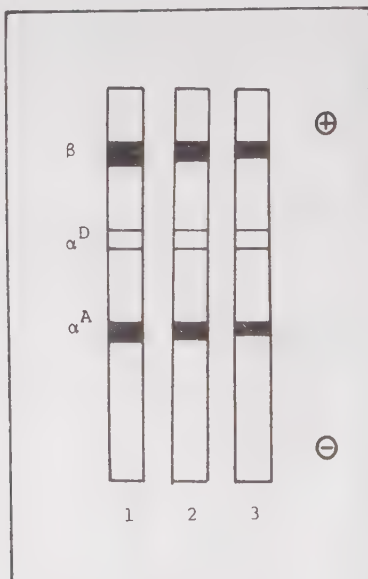


Abb. 9

Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Triton X-100, unter denaturierenden Bedingungen.

Die Banden der β - und α^A -Ketten sind einheitlich, die der α^D -Ketten spalten auf.

Probe: 40 μ g Hämoglobin

- 1 = Leghorn A
- 2 = Rhodeländer
- 3 = Sonnerathuhn

2.3 Präparative Kettentrennung

Die Kettentrennungen mit (200 - 350 mg) Globin der drei Hühner zeigten ein identisches Elutionsprofil. Drei Hauptgipfel entsprachen den α^D -, α^A - und β -Ketten (in Reihenfolge der Elution; s. Diagramm 20, 21 und 22).

2.4 Tryptische Peptide der α^D -Ketten

600 - 900 nmol α^D -Ketten von Leghorn A (*Gallus gallus*) und Rodeländer (*Gallus gallus*) wurden mit Trypsin verdaut (siehe III.5.1).

Die Hydrolysate wurden mit HPLC über LiChrosorb RP-2 (siehe III.6.2) chromatographiert. Durch Alterung der Säule (geringeres Auflösungsvermögen) wurde die Schärfe der Peaks vermindert. Das Chromatogramm der beiden α^D -Ketten war identisch (s. Diagramm 23 + 24). Die Aminosäureanalyse der Peptide von Rodeländer (Tab. VI) und Leghorn A ergab keinen Unterschied.

Diagramm 20

Kettentrennung des Leghorn A-Globins über CM-Cellulose
 Säule: 2,5 x 18 cm
 Puffer: 50 mM Ammoniumacetat pH 5,4; 8 M Harnstoff
 0,02% β -Mercaptoäthanol
 Flußrate: 40 ml/h
 Gradient: 300 ml 0,0 - 0,1 mM NaCl log.
 600 ml 0,1 - 0,2 mM NaCl lin.
 230 ml 0,2 - 0,5 mM NaCl log.
 Probe: 350 mg in 20 ml Startpuffer

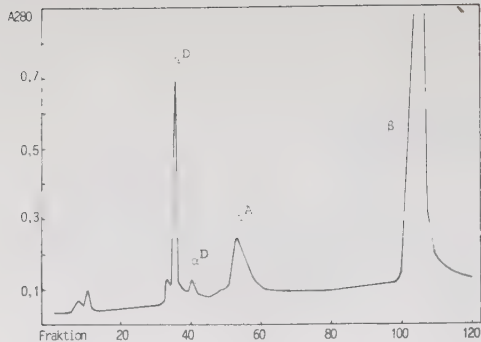


Diagramm 20 (Legende s. S.69 unten)

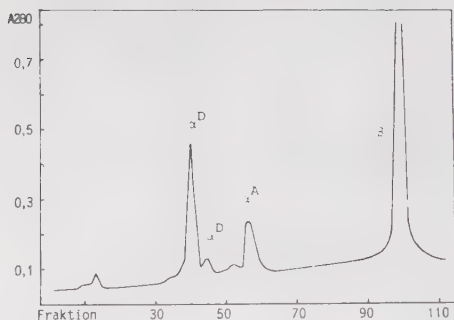


Diagramm 21

Kettentrennung des Rhodeländer-Globins über CM-Cellulose
Bedingungen siehe Diagramm 20 jedoch
Probe: 200 mg in 20 ml Startpuffer

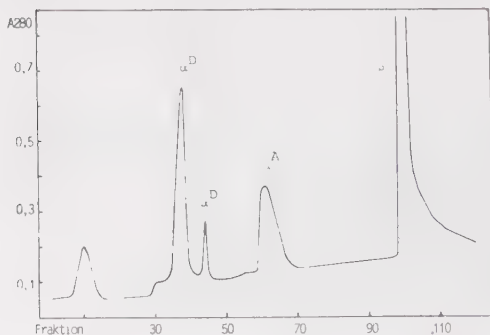


Diagramm 22

Kettentrennung d. Sonnerathuhn-Globins über CM-Cellulose
Bedingungen siehe Diagramm 20 jedoch
Probe: 200 mg in 20 ml Startpuffer

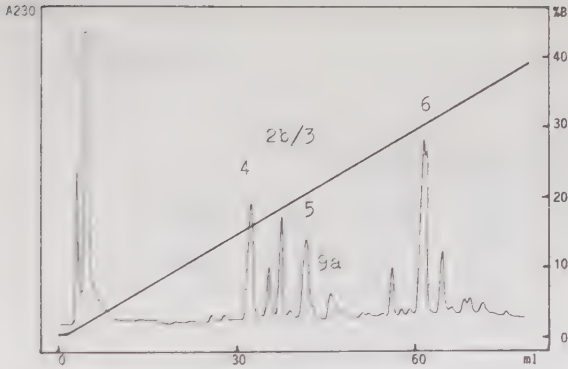


Diagramm 23

Trennung der tryptischen Peptide der α -D-Kette
von Leghorn A mittels HPLC

Säule: 4,6 x 250 mm
LiChrosorb, RP 2, 7 μ m
Puffer A: 50 mM Ammoniumacetat
pH 6,0
Puffer B: Acetonitril + 0,83% HAC
Flußrate: 2 ml/min.
Gradient: nach 1 min. 1 %/min.
Probe: ca. 10 nmol in 50 μ l verd.
HAC

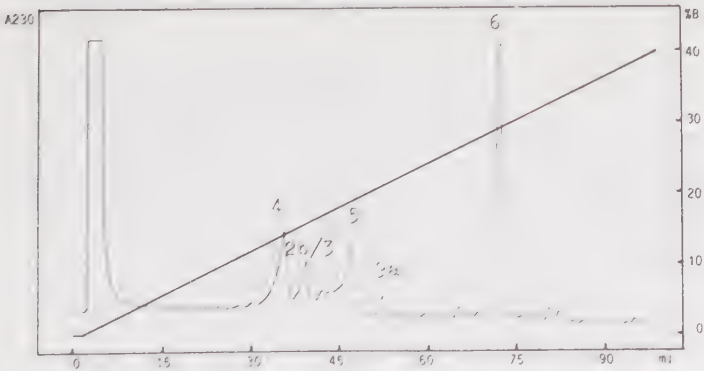


Diagramm 24

Trennung tryptischer Peptide der α -D-Ketten
des Rhodeländerhuhns mittels HPLC
Bedingungen siehe Diagramm 23

Tabelle VI

Analysen der tryptischen Peptide der α^D -Ketten
des Rhodeländerhuhns (*Gallus gallus*)

Pos.	Tp2b/3 9-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp9a 62-71
Asx	-	-	-	2.14(2)	0.95(1)
Thr	-	1.01(1)	2.70(3)	0.82(1)	-
Ser	-	1.02(1)	-	2.03(2)	-
Glx	2.88(3)	4.07(4)	1.24(1)	1.16(1)	-
Pro	-	-	0.91(1)	1.78(2)	-
Gly	-	1.17(1)	-	1.03(1)	2.37(2)
Ala	1.09(1)	3.60(4)	-	-	2.03(2)
Cys	-	-	-	-	-
Val	-	-	-	0.91(1)	1.55(2)
Met	-	-	0.77(1)	-	-
Ile	0.80(1)	-	-	-	-
Leu	1.04(1)	1.06(1)	-	1.27(1)	2.09(2)
Tyr	-	-	1.06(1)	0.98(1)	-
Phe	-	1.06(1)	1.02(1)	1.80(2)	-
Trp	- (1)	-	-	-	-
Lys	1.19(1)	-	1.30(1)	-	1.00(1)
His	-	1.14(1)	-	1.10(1)	-
Arg	-	0.94(1)	-	0.98(1)	-
Summe	8	15	9	16	10

Die Zahlen in den Klammern sind die Summenformeln der
Peptide der α^D -Ketten des Leghorn A und die
der identischen Peptide des Rhodeländerhuhns.

V. DISKUSSION

Der Andenkondor (*Vultur gryphus*, L., 1758⁽⁹⁶⁾) aus dem Genus *Vultur* gehört zur Familie der Cathartidae aus der Ordnung der Cathartiformes (Neuweltgeier) (Wolters)⁽⁹⁶⁾.

Mit 3 Meter Flügelspannweite ist er der größte flugfähige Landvogel der Erde. Der Andenkondor ernährt sich von Aas. Um dieses zu finden, segelt er in den Aufwinden⁽⁹⁷⁾ sowohl an den Küsten von Chile und Peru⁽⁹⁸⁾, als auch über den Hochebenen der Anden (über 4000 m) zwischen Baum- und Schneegrenze. Sein Verbreitungsgebiet reichte von Peru über Chile bis an den argentinischen Atlantik und von Feuerland bis Venezuela⁽⁵⁾. Im Gegensatz zum Kalifornischen Kondor (*Gymnogyps californianus* (Shaw, 1797)), von dem nur 20 Exemplare übriggeblieben sind, ist der Andenkondor mit ca. 1000 Exemplaren nicht so stark vom Aussterben bedroht, ist aber z.B. in Venezuela schon ausgerottet⁽⁹⁹⁾.

1. Das Hämoglobin des Andenkondors

Durch Stärkegelelektrophoresen wies De Smet nach, daß ca. 90% der Vogelhämoglobine aus mehr als einer Komponente bestehen⁽¹⁰⁰⁾. Bis zu vier Komponenten konnten voneinander getrennt werden. Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese trennen sich die bisher untersuchten nativen adulten Vogelhämoglobine meist in zwei Komponenten auf^(34,101,102,103,104,-105), einige sind allerdings auch einheitlich. So kann bei Graureiher (*Ardea cinerea*, L., 1758)⁽¹⁰⁶⁾, Storch (*Ciconia*

ciconia (L., 1758))⁽¹⁰⁶⁾ und Ararauna (Ara ararauna (L., 1758))⁽¹⁰⁶⁾ nur eine Komponente nachgewiesen werden.

Im Hämoglobin des Andenkondors wird mit Polyacrylamidgелеlektrophorese eine Haupt- (HbA) und eine Nebenkomponeⁿte (HbD) gefunden. Die Nebenkomponeⁿte des Andenkondors wandert im Vergleich zur entsprechenden Komponente des Hühnerhäoglobins (Gallus gallus, L., 1758) und anderer Vögel langsamer in Richtung Anode. Daraus läßt sich schließen, daß diese Nebenkomponeⁿte weniger negativ geladen sein sollte.

In der denaturierenden Polyacrylamidgелеlektrophorese mit Triton trennte sich das Hämoglobin des Andenkondors in drei Banden auf. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt von der beta- über die alpha^D-Kette zur alpha^A-Kette zu. Durch einen Vergleich dieser Elektrophoresen mit denen des Hühnerhäoglobins läßt sich eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit der alpha^D-Kette des Andenkondors feststellen.

2. Primärstruktur-Funktion-Beziehung

Die Primärstrukturen der Hämoglobine haben sich im Laufe der Evolution durch Mutationen verändert. Trotz größerer Änderungen ist die reversible Bindung des Sauerstoffs bei allen Hämoglobinen erhalten geblieben. Hämoglobine, deren Funktion eingeschränkt oder aufgehoben war, wurden durch Selektion entfernt. Deshalb sind in einigen Positionen der Hämoglobine keine Substitutionen von Aminosäuren möglich. Die Hämbindungsstellen sind ebenso wie alpha₁beta₂-Bindungsstellen im wesentlichen konstant.

Man kennt eine große Zahl von "abnormalen Humanhämoglobinen", bei denen gegenüber dem normalen HbA jeweils nur eine Aminosäure ausgetauscht ist⁽³⁵⁾. Viele dieser Substitutionen haben keinen Einfluß auf die Funktion des Moleküls, andere jedoch führen zu einer Steigerung oder Senkung der Sauerstoffaffinität. Einige "abnormale Hämoglobine" sind in ihren Eigenschaften so stark verändert, daß sie für ihren Träger letal sind, z.B. instabile Hämoglobine, solche die ihr Häm verlieren, in ihre Untereinheiten dissoziieren oder aggregieren^(35,105,106). Nahezu alle Mutationen an Hämbindungsstellen, $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen, Positionen an denen der Bohreffekt beeinflußt wird, und Phosphatbindungsstellen bewirken eine Änderung der Funktion.

Es besteht die Möglichkeit, Hämoglobine durch Substitutionen gerade an diesen konservativen Positionen an neue Umweltbedingungen zu adaptieren. Beim Vergleich von nahe verwandten Tierarten, die jedoch in Biotopen leben, die verschiedene Ansprüche an das Hämoglobin stellen, wurden Änderungen der Primärstruktur gerade an diesen obengenannten Positionen festgestellt. In dieser Weise wirkt das Asparagin in beta 2 (Phosphatbindungsstelle) beim Lama gegenüber Histidin beim Kamel (*Camelus bactrianus*, L., 1758)⁽²³⁾. Das Hämoglobin des Lamas hat nur noch 5 Phosphatbindungsstellen gegenüber 7 des Kamels. Der Verlust dieser Bindungsstelle senkt den Einfluß des Phosphats und bewirkt eine Steigerung der Sauerstoffaffinität⁽³⁾.

Die Streifengans hat durch eine Substitution von Prolin nach Alanin in alpha 119 ($\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstelle) gegenüber

ihrer Verwandten der Graugans^(1,2,21) einen Vorteil für den Flug in großen Höhen. Der Vorteil liegt in einer Erhöhung der Sauerstoffaffinität. Durch diese phylogenetische Adaptation an große Höhen erübrigt sich eine individuelle Anpassung⁽¹⁰⁷⁾. Um die Konstanz der funktionellen Stellen deutlich zu machen, werden die jeweils entsprechenden Ketten homolog miteinander verglichen. Für den Vergleich wurden die alpha- und beta-Ketten der Säuger, Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische herangezogen⁽³⁴⁾.

2.0.1 Alpha-Ketten aller bekannten Hämoglobine

Bei einem Vergleich der bis heute sequenzierten alpha-Ketten der Hämoglobine der obengenannten Klassen der Fauna gibt es nur 25 Aminosäuren, die bei keiner Art substituiert wurden. Darunter befinden sich 9 der 16 Hämbindungsstellen und 8 der 15 $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen.

2.0.2 Beta-Ketten aller bekannten Hämoglobine

Derselbe Vergleich für die beta-Ketten dieser Klassen ergibt 34 Positionen, in denen keine Austausche stattgefunden haben. 12 der 16 Häm- und 10 der 16 $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen, aber nur 2 $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen blieben konstant. Neben diesen funktionellen Stellen wurden bei den alpha-Ketten in 9 und bei den beta-Ketten in 13 weiteren Positionen keine Substitutionen gefunden. Dies könnte ein Indiz für eine essentielle Bedeutung der Aminosäuren in diesen Positionen für die Funktion des Hämoglobins sein.

Beim Vergleich der Hämoglobinketten der Klassen der Säuger, Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische sind folgende Bindungsstellen konstant gebliebenen :

	der alpha-Ketten			der beta-Ketten		
	invar.	total	%invar.	invar.	total	%invar.
Hämbindungsstellen	9	16	56%	12	16	75%
$\alpha_1\beta_2$	8	15	53%	10	16	62%
$\alpha_1\beta_1$	2	16	12%	2	17	12%
IPP	-	-	-	3	6	50%

2.1 Vergleich der Ketten der (adulten) Vogelhämoglobine

(siehe dazu die Tabellen VII, VIII und IX)

2.1.1 Alpha-Ketten aller bekannten Hämoglobine der Vögel

Beim Vergleich der alpha-Ketten dieser Vögel sind 16 Häm-, 13 der 15 $\alpha_1\beta_2$ - und 6 der 16 $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen invariant.

2.1.2 Beta-Ketten aller bekannten Hämoglobine der Vögel

Die 105 beim Vergleich aller adulten und embryonalen beta-Ketten der Vogelhämoglobine identischen Positionen enthalten sämtliche Hämbindungsstellen, alle $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen bis auf eine, 8 der 17 $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen und die Hälfte der IPP-Bindungsstellen.

Beim Vergleich der Hämoglobinketten der Vögel konstant gebliebene Bindungsstellen:

	der alpha-Ketten			der beta-Ketten		
	invar.	total	%invar.	invar.	total	%invar.
Hämbindungsstellen	16	16	100%	16	16	100%
$\alpha_1\beta_2$	13	15	87%	15	16	94%
$\alpha_1\beta_1$	6	16	38%	8	17	47%

Neben diesen invarianten Bindungsstellen treten in den alpha- und beta-Ketten der Vögel 39 bzw. 69 konstante Positionen auf, die für den jeweiligen Kettentyp der Vogelhämoglobine typisch sind.

2.2 Austausch funktioneller Seitenketten

Seitenketten, die eine wichtige Funktion im Hämoglobin ausüben und dennoch ausgetauscht wurden, sind im folgendem Abschnitt behandelt.

2.2.1 Allosterische Kontrolle durch organische Phosphate und ihr Einfluß auf die Sauerstoffaffinität des Vogelhämoglobins.

In adulten Vogelhämoglobinen wird die Sauerstoffaffinität vor allem durch das organische Phosphat IPP geregelt^(22,26). Durch eine Erhöhung der IPP-Konzentration wird die Sauerstoffaffinität gesenkt^(24,108).

Je ein Polyphosphation dringt in die zentrale Kavität des Tetramers ein. 5 negative Phosphatgruppen werden durch 12 positiv geladene Aminosäuren (6 je Kette) in den Positionen

1, 2, 82, 135, 139, 143 gebunden. Dadurch wird die T-Struktur stabilisiert⁽¹⁰⁸⁾.

Aminosäuren an Bindungsstellen allosterischer Effektoren⁽²¹⁾.

	NA1	NA2	EF6	H13	H17	H21	H22
Effektor beta	1	2	82	135	139	143	144

HCO ₃ ⁻	Ac-Ala	-	Lys	-	-	-	Glu
2,3-DPG	Val	His	Lys	-	-	His	-
IPP	Val	His	Lys	Arg	His	Arg	-
ATP,GTP	Val	Glu	Lys	-	-	Arg	-

Kondor :	Val	His	Lys	Arg	His	Arg	Lys
----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Strauß¹,

Nandu²,

Star ³ :	Val	<u>Gln</u>	Lys	Arg	His	Arg	Lys
---------------------	-----	------------	-----	-----	-----	-----	-----

Huhn

rho :	Val	His	Lys	<u>Ser</u>	<u>Lys</u>	Arg	Lys
-------	-----	-----	-----	------------	------------	-----	-----

Huhn

epsilon:	Val	His	Lys	<u>Asn</u>	His	Arg	Lys
----------	-----	-----	-----	------------	-----	-----	-----

¹ Strauß (*Struthio camelus*, L., 1758)

² Nandu (*Rhea americana* (L., 1758))

³ Star (*Sturnus vulgaris*, L., 1758)

Bei adulten Vogelhämoblobinen wurde lediglich eine Substitution in den Phosphatbindungsstellen gefunden. In beta 2 (NA 2) ist bei einigen Vögeln Histidin gegen Glutamin ausge-

tauscht^(109,110). Bei zwei verschiedenen Hämoglobinen des Graukänguruhs (*Macropus gigantus tasmaniensis*, Le Souef, 1923) wurde in einem (HbI) Glutamin und im anderen (HbII) Histidin gefunden. Der zur Halbsättigung nötige Sauerstoffpartialdruck P_{50} von HbII-His ist um 1,3 Torr höher als von HbI-Gln (26,1 bzw. 24,8 Torr)⁽¹¹¹⁾.

Diese Position ist in den beta-Ketten des Andenkondors, wie bei den meisten anderen Vögeln, mit Histidin besetzt. Nur bei Strauß⁽¹⁰⁹⁾, Nandu⁽¹⁰⁹⁾ und Star⁽¹¹⁰⁾ wurde ein Austausch durch Glutamin gefunden.

In den embryonalen beta-ähnlichen Ketten des Huhns, rho⁽¹¹²⁾ und epsilon⁽¹¹²⁾, wurden ebenfalls 3 Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen. In der rho-Kette bedeutet der Austausch von Arginin (-NH) durch Serin (-OH) in rho 135 (H 13) für das embryonale Hämoglobin den Verlust einer Phosphat-Bindungsstelle. Trotz des Ausfalls einer IPP-Bindungsstelle in der embryonalen Hämoglobinkette rho wird mit IPP eine größere O_2 -Affinitätssenkung als mit DPG und ATP beobachtet⁽²⁰⁾.

2.2.2 Hämbindungsstellen

Sowohl in den alpha- als auch in den beta-Ketten aller Vogelhämoglobine sind alle Hämbindungsstellen konstant. Im Gegensatz zu den menschlichen beta-Ketten werden bei Vögeln in beta 70 (E 14) Serin statt Alanin nachgewiesen. Jedoch ist dieser Austausch auch bei vielen Säugern und Reptilien zu finden. Eine für Vögel typische Aminosäure in den Hämbindungsstellen konnte nicht gefunden werden.

2.2.3 $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen

In den $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen konnten bei Vögeln nur die bereits beschriebenen Aminosäuren nachgewiesen werden. Wie schon erwähnt, kann durch Substitutionen an Bindungsstellen zwischen den Untereinheiten die Sauerstoffaffinität eines Hämoglobins verändert werden. Perutz und Fermi⁽¹¹³⁾ untersuchten abnormale Hämoglobine des Menschen und ihre Änderungen in der O_2 -Affinität. Dabei stellten sie fest, daß durch den Verlust von Salzbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, unpolaren Interaktionen und die T-Struktur stabilisierender Bindungen die intrinsische Sauerstoffaffinität eines Hämoglobins erhöht wird. Der Verlust von Bindungen, die die R-Struktur stabilisieren, und das Entstehen von solchen, die die T-Struktur fördern, bewirkt eine Senkung der intrinsischen Sauerstoffaffinität.

Im folgenden werden Veränderungen an solchen Bindungsstellen untersucht. Hierzu wird die Primärstruktur des Andenkondors anhand des von Perutz und Fermi erstellten Raummodelles des menschlichen Hämoglobins diskutiert^(15,18). Durch Substitutionen an $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen sind Veränderungen der Quartärstruktur möglich. Die Stabilität der Tertiärstruktur kann durch einen Austausch von interhelikalen $\alpha_1\alpha_1$ - bzw. $\beta_1\beta_1$ -Bindungsstellen beeinflusst werden.

Im nichthelikalen CD-Bereich der beta-Kette (CD 43) ist beim Andenkondor und allen Vögeln, mit Ausnahme der Unterfamilie Anserinae aus der Ordnung Anatiformes, Glutamin durch Alanin ersetzt. Dadurch ist die Wasserstoffbrückenbindung zum

Arginin (FG4 Pos.92) der alpha-Ketten weder in der R- noch in der T-Struktur möglich.

2.2.4 $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen

In beta G18 (116) ist bei allen Vogelhämoglobinen Histi-
din durch Alanin ersetzt. Eine $\alpha_1\beta_1$ -Bindung mit dem
Carboxyl-Sauerstoff des Prolins in alpha A GH2 (114) ist dem
unpolaren Alanin nicht möglich. Ebenso wenig ist eine Bindung
mit dem Amid-Sauerstoff des Glycins GH2 (114) der al-
pha^D-Ketten durchführbar.

In den Ketten (α^A und beta) der Hauptkomponenten HbA
aller Vögel wurden die Bindungsstellen innerhalb der Monome-
ren ($\alpha_1\alpha_1$ und $\beta_1\beta_1$) in gleicher Anzahl durch
Substitutionen vermindert. Der Austausch von Serin durch
Glycin in beta E16 (72) in allen beta-Ketten der Vogelhämo-
globine macht so eine interhelikale Bindung mit dem Carbox-
yl-Sauerstoff des Glycins in beta E12 (68) unmöglich.

In den α^A -Ketten aller Vögel ist die interhelikale Bin-
dung zwischen der G- und H-Helix durch die Substitution der
beiden Serine in alpha G9 (102) und alpha H16 (133), durch
apolare Seitenketten, unterbrochen. In der G-Helix der al-
pha^A-Ketten der Vögel ist durch Serin G9 (102) bzw. Cystein
G11 (104) gegen apolare Reste eine intrahelikale Bindung
nicht mehr möglich. Die Bindungen innerhalb der H-Helix über
die Serine H16 (133) und H21 (138) mit dem Sauerstoff der
Peptidbindungen von Leucin H12 (129) bzw. Threonin H17 (134)
können bei Vögeln nicht gebildet werden, da die hydrophilen
Serine durch die neutralen Aminosäuren Glycin und Alanin
ausgetauscht sind.

Weiterhin sind Substitutionen an den Berührungsstellen zwischen den Helices der α^D -Ketten zu erwähnen. Im Raummodell des Human-Hämoglobins nähert sich die A- der H-Helix und bildet zwischen Asparagin in A7 (9) und Serin H7 (124) eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Bei allen α^D -Ketten der Vögel können Leucin bzw. Alanin diese Wasserstoffbrücken nicht bilden. Ebenso sollte die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Threonin E16 (67) und Tryptophan A12 (14) beim Andenkondor durch Glycin in E16 (67) aufgehoben sein. Im Raummodell des Humanhämoglobins führt die Nähe von zwei Serinen in H16 (133) und G9 (102) zur Bildung einer Wasserstoffbrücke. Diese wird beim Andenkondor durch einen Austausch von Serin durch Alanin in H16 (133) verhindert. In den α^D -Ketten des Andenkondors finden sich 3 intrahelikale Bindungsstellen weniger als in den α -Ketten des Humanhämoglobins. Durch den Austausch von Aminosäuren mit Hydroxylgruppen (Ser und Thr) durch neutrale Aminosäuren (Gly, Ala, Val) werden in der E-Helix (E16 (67) - E12 (63)), der G-Helix (G15 (108) - G11 (104)) und der H-Helix (H16 (133) - H12 (129)) die Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Sauerstoff der Peptidbindungen unterbrochen.

Durch den Ausfall mehrerer Bindungsstellen und die dadurch bedingte Auflockerung der Struktur der Hämoglobine erfolgte bei den Vögeln eine Steigerung der intrinsischen Sauerstoffaffinität gegenüber den Säugern^(109,113). Zum Beispiel beträgt der P_{50} für Sauerstoff bei der Hämoglobinkomponente HbA des Strauß ohne Phosphate 4,7 Torr⁽¹⁰⁹⁾, während beim Humanhämoglobin HbA die Halbsättigung für Sauerstoff erst

bei 12 Torr^(109,114) erreicht wird.

Bei α^A - und beta-Ketten lassen sich innerhalb der Vögel keine Unterschiede in der Anzahl der möglichen Bindungsstellen der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen feststellen. In den Bindungsstellen der Sekundärstruktur und Tertiärstruktur der α^D -Ketten bestehen Unterschiede innerhalb der Klasse der Vögel. In den α^D -Ketten des Andenkondors und des Straußes sind 6 inter- und intrahelikale Bindungen durch Substitutionen unterbrochen, im Gegensatz zu 3 beim Huhn und einer beim Fasan. Die NebenkompONENTEN HbD von Andenkondor und Strauß sollten eine höhere O_2 -Affinität aufweisen, als die von Huhn und Fasan. Die intrinsische Sauerstoffaffinität des Straußes ist mit einer O_2 -Halbsättigung bei 2,4 Torr⁽¹⁰⁹⁾ tatsächlich höher als beim Huhn (8 Torr)⁽¹¹⁵⁾.

Vergleich der alpha^A-Ketten der Vogelhämglobine 1 - 30

	5	10	15	20	25	30		5	100	5	110	5	120
HAKO	V L S G S D K T N V K G V E A K I G G H A E D Y G A E T L E						HAKO	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAQC	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HAQC	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HANA	V L S G P D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HANA	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAOS	V L S G T O K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HAOS	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAHS	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HAHS	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAGG	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HAGG	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HACH2	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HACH2	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HASTG	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HASTG	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAKG	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HAKG	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAFa	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HAFa	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HASE	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HASE	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HASR	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HASR	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HASFG	V L S A O D K T N V K G V E S K I G G H A E E Y G A E T L E						HASFG	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E					
HAFL	V L S S H D K S N V K G L E F G K V G H L E F Y C A E T L A						HAFL	L R V D P V N F K L L A H C F L V V A I H H P S V L T P E					

Vergleich der alpha^A-Ketten der Vogelhämglobine 31 - 60

	31	5	40	5	50	5	60		121	5	130	5	140
HAKO	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K G H G K						HAKO	V H A S L D K F L C A V G N V L T A K Y R					
HANc	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HANc	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HANA	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HANA	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAOS	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HAOS	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAHS	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HAGG	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAGG	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HACH2	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HACH2	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HASTG	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASTG	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HAKG	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAFa	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HAFa	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASE	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HASE	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASR	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HASR	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASFG	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HASFG	V H A S M D K F L C A V A T V L T A K Y R					
HAFL	R M F E I T A Y P Q T K T Y E P P H F D L Q H G S A Q I K A H G K						HAFL	V H A S L D K F L C A V A T V L T A K Y R					

Vergleich der alpha^A-Ketten der Vogelhämglobine 61 - 90

	61	5	70	5	80	5	90		121	5	130	5	140
HAKO	K V V S A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAKO	V H A S L D K F L C A V G N V L T A K Y R					
HAQC	K V V S A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAQC	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HANA	K V V S A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HANA	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAOS	K V A A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAOS	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAGG	K V A A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAGG	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HACH2	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HACH2	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASTG	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HASTG	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAKG	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAKG	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HAFa	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAFa	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASE	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HASE	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASR	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HASR	V H A S L D K F L C A V G A V L T A K Y R					
HASFG	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HASFG	V H A S M D K F L C A V A T V L T A K Y R					
HAFL	K V V A A L I E A A N N H I D D I A G A L S K L S D L H A O K						HAFL	V H A S L D K F L C A V A T V L T A K Y R					

Vergleich der alpha^D-Ketten der Vogelhämglobine 1 - 30

HAKO	V L S G S D K T N V K G V F A K I G G H A E D Y G A E T L E	30
HAKG	M L T A A D K K L I Q Q T W E K V V G H Q E D F G A E A L Q	
HADKO	M L T A A D K K L I Q Q A I W E K V G H Q E D F G A E A L Q	
HADQC	M L T A A D K K L I Q Q A I W E K V G H Q E D F G A E A L Q	
HADOS	M L T A A D K K L I Q Q A I W E K V G H Q E D F G A E A L Q	
HADME	M L T A E D K K L I Q Q A I W E K A A S H Q E E F F G S E A L Q	
HACHI	M L T A E D K K L I Q Q A I W E K A A S H Q E E F F G S E A L Q	
HADNA	M L T A E D K K L I Q Q A I W E K A A S H Q E E F F G S E A L Q	
HADFA	M L T A E D K K L I Q Q A I W E K A A S H Q E E F F G S E A L Q	
HADSR	V L T A E D K K L I Q Q T W G K L G G A E E E I G A E A L W	

Vergleich der alpha^D-Ketten der Vogelhämglobine 31 - 60

HAKO	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L Q H G S A Q I K G H G K	60
HAKG	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L Q H G S A Q I K A H G K	
HADKO	R M F I S Y P P O T K T Y F P H F D L S C G S D Q I R S H G K	
HADQC	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L S A G S D Q I R G H G K	
HADOS	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L H P G S E Q I R G H G K	
HADME	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L H P G S E Q I R G H G K	
HACHI	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L H P G S E Q I R G H G K	
HADNA	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L H V G S E Q V R G H G K	
HADFA	R M F I T Y P P O T K T Y F P H F D L H V G S E Q V R G H G K	
HADSR	R M F H A Y P P T K T Y F P H F D L S Q G S D Q I R G H G K	

Vergleich der alpha^D-Ketten der Vogelhämglobine 61 - 90

HAKO	K V V G A L I E A A N H I D D I A A S L S K L S D L H A Q K	90
HAKG	K V A A L V E A V N H I D D I A G A L S K L S D L H A Q K	
HADKO	K V V A A L G N A V K S L D N L S Q A L S E L S N L H A Y N	
HADQC	K V V A A L G N A V K S L D N L S Q A L S E L S N L H A Y N	
HADOS	K V A A A L G N A V K S L D N L S Q A M S E L S N L H A Y N	
HADME	K V A A A L G N A V K S L D N L S Q A L S E L S N L H A Y N	
HACHI	K V L G A L G N A V K N V D N L S Q A M A E L S N L H A Y N	
HADNA	K V L A A L S N A V K N V D N L S Q A L S E L S N L H A Y N	
HADFA	K V L G A L S N A V K N V D N L S Q A L S E L S N L H A Y N	
HADSR	K V V A A L G N A I K I K N L D N L S Q A L S E L S N L H A Y N	

Vergleich der alpha^D-Ketten der Vogelhämglobine 91 - 120

HAKO	L R V D P V N F K L L G Q C F L V V A I H H P S V L T P E	120
HAKG	L R V D P V N F K L L G H C F L V V A I H H P S A L T P E	
HADKO	L R V D P V N F K L L S Q C F Q V L A V H L G A E Y T P E	
HADQC	L R V D P V N F K L L S Q C F Q V L A V H L G A E Y T P E	
HADOS	L R V D P V N F K L L S Q C F Q V L A V H M G K D Y T P E	
HADME	L R V D P V N F K L L S Q C F Q V L A A H L G K D Y T P E	
HACHI	L R V D P V N F K L L S Q C I Q V L A V H M G K D Y T P E	
HADNA	L R V D P V N F K L L S Q C I Q V L A V H M G K D Y T P E	
HADFA	L R V D P V N F K L L S Q C I Q V L A V H M G K D Y T P E	
HADSR	L R V D P V N F K L L S Q C L Q V L A T R L G K E Y S P E	

Vergleich der alpha^D-Ketten der Vogelhämglobine 121 - 141

HAKO	V H A S L D K K P L C A V G N V L T A K Y R	140
HAKG	V H A S L D K K P L C A V G T V L T A K Y R	
HADKO	V H A A F D K K P L S A V A A V L A E K Y R	
HADQC	V H A A F D K K P L S A V A A V L A E K Y R	
HADOS	V H A A Y D K K P L T A V A A V L A E K Y R	
HADME	M H A A F D K K P L S A V A A V L A E K Y R	
HACHI	V H A A F D K K P L S A V A A V L A E K Y R	
HADNA	V H A A Y D K K P L S A V A A V L A E K Y R	
HADFA	V H A A F D K K P L S A V A A V L A E K Y R	
HADSR	V H S A V D K K F M S A V A A V L A E K Y R	

3. Evolution

3.1 Geschichtlicher Abriß der Einordnung der Cathartiformes in die Systematik

In letzter Zeit erschienen aus anderen Fachgebieten Hinweise auf eine Verwandtschaft der Ciconiiformes mit den Cathartiformes^(5,115,116). König⁽⁵⁾ zeigte, daß viele anatomische und ethologische Ähnlichkeiten zwischen beiden Ordnungen bestehen. Er stellte die Cathartiformes und Ciconiiformes in noch viel größere Nähe als Wolters⁽⁹⁷⁾, indem er sie in einer Ordnung zusammenfaßte. König trat für eine nähere Zuordnung zu den Ciconiiformes ein. Schon 1873 empfahl Garrod⁽¹¹⁸⁾ die Cathartiformes zu den Störchen und Reiher zu stellen, da es unmöglich sei, sie in einen engen Zusammenhang mit den Falconiformes zu bringen. Goodchild^(119,120) bestätigte diese Differenz durch vergleichende Studien über die Anordnung der Federn. Er rückte sie in die Nähe der Pelikane (Ruderfüßler). Shufeldt publizierte 1883⁽¹¹⁸⁾ eine Osteologie der Cathartiformes und Pycraft 1902⁽¹²¹⁾ eine der Falconiformes. Sharpe⁽¹¹⁸⁾ war 1891 der erste, der den Cathartiformes eine eigene Ordnung zugestand. Beddard⁽¹¹⁸⁾ wies 1898 auf 8 Merkmale hin, die die Falconiformes und Cathartiformes unterscheiden. Beim Vergleich der Darmschlingen fand Mitchell⁽¹¹⁸⁾ gewisse Ähnlichkeiten zwischen Cathartiformes und Ciconiiformes. Und Chandler⁽¹²²⁾ entdeckte "verblüffende Ähnlichkeiten" zwischen Pelicaniform-

mes und Cathartiformes bei vergleichenden anatomischen Studien. Compton⁽¹²³⁾ Hudson⁽¹²⁴⁾ Miller⁽¹¹⁸⁾ und Fisher⁽¹²⁵⁾ führten vergleichende Untersuchungen des Federwechsels, der Osteologie und der Myologie der Cathartiformes durch. Für Hudson⁽¹²⁴⁾ unterschieden sich die Cathartiformes so stark von den Falconiformes, daß er für drei getrennte Evolutionswege plädierte. Anhand eines Fossils des Pleisiocathartes postulierte Howard^(126,127) 1950 ebenfalls drei seit dem Eozän aufgespaltene Linien (vor ca. 50 ma; ma = Millionen Jahre). Die gleichen Hinweise auf eine polyphyletische Entstehungsgeschichte erhielt Peakall bei Papierelektrophoresen von hydrolysiertem Eialbumin⁽¹²⁸⁾.

Shibley publizierte 1960 Studien über die Eiweißelektrophoresevergleiche von Neu- und Altweltgeiern und von anderen Accipitriformes⁽¹²⁹⁾. Er folgerte daraus in einer weiteren Arbeit darüber, daß es keine direkten Hinweise auf eine Verwandtschaft von Ciconiiformes und Cathartiformes gäbe. Eher seien die Cathartiformes zu den Accipitriformes zu stellen. Die Chromatographien von Bürzeldrüsensekreten des Andenkon dors und des Riesensturchs (*Ephippiorhynchus asiaticus*) waren nicht sicher voneinander zu unterscheiden⁽¹¹⁷⁾.

So wurden im Lauf der Geschichte ornithologischer Systematik die Cathartiformes einmal der Ordnung Falconiformes als Familie (Stresemann⁽¹¹⁸⁾) oder als Unterordnung zugeschlagen, um dann wieder als Familie zu den Ciconiiformes⁽¹³⁰⁾ gestellt zu werden. Sie wurden auch mit den Pelicaniformes^(131,132) oder den Reiher⁽¹¹⁸⁾ in Verbindung gebracht. Sie wurden jedoch auch einer eigenen Ordnung zugeteilt. In

den folgenden Abschnitten soll die Einordnung der Cathartiformes in die Vogelsystematik anhand der Primärstrukturen der Hämoglobine diskutiert werden.

Besonderes Interesse wird dabei auf die Beziehung der Cathartiformes zu den Accipitriformes und Ciconiiformes verwendet. Als Vertreter dieser drei Ordnungen dienen der Andenkondor, der Steinadler (*Aquila chrysaetos* (L., 1758)) und der Weißstorch. Durch homologen Vergleich der Hämoglobinketten konnte festgestellt werden, daß bei zunehmendem Verwandtschaftsgrad der Tiere deren Proteine ähnlicher werden⁽¹³³⁾. Das heißt, bei einem Aminosäurevergleich dieser Proteine treten mit zunehmender phylogenetischer Entfernung mehr Substitutionen von Aminosäuren auf. Trotz der chronologischen Anhaltspunkte, die von der Paläontologie geliefert werden, ist eine zeitliche Einordnung schwierig. Zum Beispiel sind die Durchsetzung der Mutationen von den Faktoren Populationsgröße, selektiver Druck und Konservierung in ökologischen Nischen abhängig. Daneben spielen das Generationsintervall und die Nachkommenzahl eine Rolle. Auch die genetischen Faktoren Rekombination und Konversion, können die Evolution ungewöhnlich beschleunigen.

3.2 Verschiedene Mutationsgeschwindigkeit der Ketten der Vogelhämoglobine

Für Vögel kann das jedoch nur bedingt Gültigkeit besitzen, denn bei Vögeln wurden unterschiedliche Mutationsraten für α^D -, α^A - und β -Ketten nachgewiesen⁽³⁷⁾.

Als Beispiel dienen die Verhältnisse bei Andenkondor,

Steinadler und Strauß im Vergleich zum Fasan:

Austausche in den
 α^D - α^A - beta-Ketten

Kondor/Fasan	:	24/27	19/21	8/8 (As./Nukl.)
Steinadler/Fasan	:	21/25	18/21	8/8
Strauß/Fasan	:	23/27	17/20	5/5

Dies ergibt Verhältnisse der Mutationsraten der Aminosäuren bei:

α^D - / α^A - beta-Ketten

Kondor	:	ca. 3	/	2,38	/	1
Steinadler	:	ca. 2,63	/	2,25	/	1
Strauß	:	ca. 4,6	/	3,4	/	1

und Verhältnisse der Mutationsraten der Nukleotide bei:

α^D - / α^A - beta-Ketten

Kondor	:	ca. 3,38	/	2,63	/	1
Steinadler	:	ca. 3,13	/	2,63	/	1
Strauß	:	ca. 5,4	/	4	/	1

Die Relation der Mutationsraten in den Hämoglobinketten der Vögel

beträgt : α^D - / α^A - / beta-Ketten

von	3	/	2	/	1
bis	5,4	/	4	/	1

Aus diesem Grund muß eine andere, für die Hämoglobinkette spezifische prozentuale Austauschrate errechnet werden.

Hierzu sind jedoch nur wenige Anhaltspunkte aus der Paläon-

tologie zu bekommen. Gegen Ende des Jura vor ca. 140 ma (ma = Millionen Jahre) trat mit Archaeopteryx zum ersten Mal ein zur Klasse der Vögel gehörendes Tier auf⁽¹³⁴⁾. Ungefähr 80 - 90 ma später im frühen Eozän wurden die ersten Vorgänger der Ordnung Cathartiformes gefunden^(126,135). Vor ca. 60 ma traten zum ersten Mal rheaartige Vögel auf⁽¹³⁴⁾. In diesen 60 ma wurde zwischen den Hämoglobinen der Vertreter beider Ordnungen (Andenkondor und Nandu) die folgende Anzahl von Aminosäuren bzw. Nukleotide ausgetauscht:

In der α^D -Kette 25 Aminosäuren bzw. 32 Nukleotide

α^A -Kette 15 Aminosäuren bzw. 19 Nukleotide

beta-Kette 8 Aminosäuren bzw. 8 Nukleotide

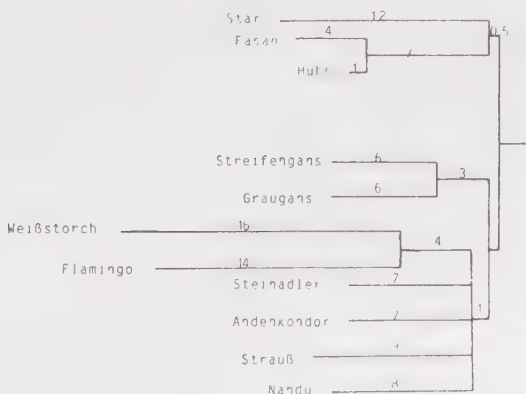
Dies bedeutet für die α^D - bzw. α^A -Ketten der Vögel eine Aminosäuresubstitution alle 4,8 ma bzw. 8 ma, während in den beta-Ketten nur alle 15 ma ein Austausch zu erwarten ist. Eine Umrechnung in Mutationseinheiten (ma / 1% Austausch) erlaubt einen Vergleich mit denen der Humanketten: In den α^A -, α^D - bzw. beta-Ketten werden ca. alle 6,8 ma, 11,2 ma, bzw. 21,2 ma 1% der Aminosäuren ausgetauscht⁽¹³⁶⁾. Diese Mutationseinheiten sind in den Humanketten mit 3,7 ma für alpha-Ketten und 3,3 ma für beta-Ketten wesentlich kleiner. Das bedeutet, daß die Evolution der Vögel sehr viel langsamer vorangegangen ist. (Oder schon seit viel längerer Zeit abgeschlossen ist.)

3.3 Homologer Vergleich der α^A -Ketten der Vögel

Die Sequenzen der verglichenen α^A -Ketten sind in Tabelle X dargestellt. Die Abbildung 10 zeigt die Differen-

zen zu dem von Wolters⁽⁹⁶⁾ aufgestellten Schema der Vogelsystematik. Die Trennung der Phoenicopteriformes (Flamingo, *Phoenicopterus ruber* L., 1758) und Ciconiiformes (Weißstorch) von den Accipitriiformes (Steinadler) und Cathartiformes (Andenkondor) hat wahrscheinlich wesentlich früher stattgefunden. Dies belegen die äußerst hohen Aminosäure- und Nukleotid-Austausche zu diesen Gruppen. Die großen Unterschiede gegenüber allen Vögeln sprechen für einen sehr frühen Ast der Störche und Flamingos in der Evolution der Vögel. Auffallend sind die etwas geringeren Differenzen zu den Hämoglobinketten der Gänse. Aufgrund der Vergleiche der α^A -Ketten der Vogelhämoglobine ist eine Zuordnung der Cathartiformes zu den Ciconiiformes als sehr unwahrscheinlich anzusehen. Zwischen diesen beiden Ordnungen bestehen mit 27 Austauschen die größten Unterschiede innerhalb der Vögel überhaupt. Im Gegensatz dazu besitzen die Accipitriiformes die geringsten Austausche zu den Cathartiformes. Das spricht für eine engere phylogenetische Verwandtschaft.

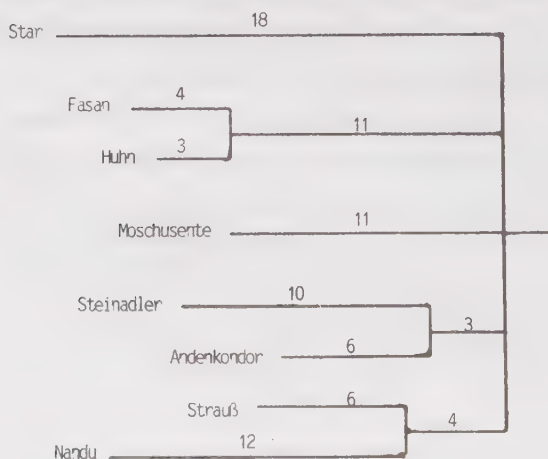
Abb. 10: Stammbaum nach den α^A -Ketten von Vogelhämoglobinen (Zahlen = Anzahl der As.-Substitutionen)



3.4 Homologer Vergleich der α^D -Ketten der Vögel

Der Vergleich der Substitutionen von Aminosäuren in den α^D -Ketten der Vögel (s. Tab. XI und Abb. 11) zeigt eine relative Nähe der Cathartiformes zu den Accipitriformes. Den Kondor trennen vom Steinadler nur 16 Austausche, während zu den anderen 19 - 27 Differenzen bestehen. Die Größenordnung der Austausche entspricht derjenigen von Nandu und Strauß, also von zwei Unterordnungen in einer gemeinsamen Ordnung. Arten einer Familie, wie Huhn und Fasan (7 As.-Substitutionen), stehen einander noch näher.

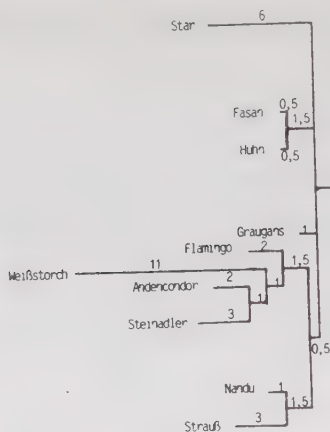
Abb.11: Stammbaum nach den α^D -Ketten von Vogelhämoglobinen



3.5 Homologer Vergleich der beta-Ketten der Vögel

Auch der Vergleich der beta-Ketten der Vogelhämoglobine (s. Tab. XII u. Abb. 12) belegt noch einmal die Vermutung, daß der Kondor dem Steinadler von allen bisher untersuchten Vögeln stammesgeschichtlich am nächsten steht. Der Unterschied der beta-Ketten vom Weißstorch zu denen anderer Vögel ist so erheblich, daß die Abtrennung der Störche vom Stammbaum der Vögel früher stattgefunden haben muß, als die der Singvögel (Star). Im adulten Storch fehlen jedoch α^D -Ketten. Ihre Funktion mußte wahrscheinlich von den α^A -Ketten mit übernommen werden. Dies könnte eine Mutationssteigerung durch funktionelle Selektion bedingt haben. Durch eine für die Ciconiiformes (Storch) spezifische, hohe Mutationsrate wäre es denkbar, daß die Ciconiiformes trotz dieser großen Unterschiede eine Beziehung zu den Cathartiformes haben. Die hohe Mutationsrate bei den beta-Ketten spricht jedoch dagegen. Anders hingegen sind die Verhältnisse beim Flamingo (Phoenicopteriformes), dem ebenfalls die α^D -Ketten fehlen. Er hat eine hohe Mutationsrate in den α^A -Ketten und eine niedrige in den beta-Ketten. Diese Theorie bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit für die niedrige Mutationsrate der beta-Ketten der Phoenicopteriformes (Flamingo), bei zugleich vielen Austauschen in den α^A -Ketten.

Abb. 12: Stammbaum nach den beta-Ketten von Vogelhämoglobinen



Zusammenfassend ist nochmals zu betonen, daß der Kondor dem Steinadler von allen bislang untersuchten Vögeln am nächsten steht. In wie weit die vielen Differenzen zu den Hämoglobinen des Storchs durch funktionelle Änderungen, die in der Lebensweise und vor allem durch das Fehlen einer α^D -Kette bedingt sind, läßt sich nur spekulieren. Dennoch scheinen die Cathartiformes den Accipitriformes näher zu stehen als den Ciconiiformes (siehe Tabelle XIII).

Tabelle XIII:

Anzahl der Austausch von Aminosäuren (As.) und Nukleotiden (Nukl.) bei homologem Vergleich der beta-, α^A - und α^D -Ketten von Andenkondor, Steinadler und Weißstorch.

	beta	α^A	α^D
	As/Nukl.	As/Nukl.	As/Nukl.
Kondor/Steinadler:	5/5	14/15	18/25
Kondor/Storch:	14/14	27/30	—

Tabelle X

Vergleiche von alpha₁-Ketten der Hamoglobine der Vögel und alpha-Ketten des Menschen und des Pferdes:

HAHU	HAHO	HAHO	HAQC	HANA	HAOS	HAHS	HACH2	HASTG	HAKG	HAPA	HADK	HASR	HASFG	HAFL	HAWs
HAHU	17	57	57	63	56	53	53	56	52	50	50	54	56	58	60
HAHO	41	55	52	59	52	48	47	51	49	46	58	58	52	57	57
HAQC	44	46	15	19	18	17	17	18	18	21	22	25	26	27	30
HANA	44	14	14	20	19	21	19	20	18	21	25	30	29	32	25
HAOS	44	15	17	19	19	22	23	26	24	24	27	30	28	33	33
HAHS	44	16	16	17	14	15	15	20	16	20	17	30	29	31	29
HACH2	40	16	18	19	14	4	4	7	3	22	7	27	20	26	27
HASTG	41	17	17	20	14	17	17	3	3	20	7	23	17	32	27
HAKG	42	17	17	21	18	20	16	17	20	5	18	25	29	31	34
HAPA	40	18	16	21	15	7	3	16	6	20	10	26	20	25	28
HADK	40	18	19	20	15	3	2	18	5	21	8	24	18	25	28
HASR	40	19	18	24	17	20	18	18	19	19	19	30	33	36	36
HASFG	41	20	21	23	15	6	6	9	7	18	23	23	23	29	33
HAFL	41	22	26	25	23	20	21	23	21	24	20	21	24	30	34
HAWs	42	23	25	25	24	16	13	16	14	26	18	21	24	26	34
HAHU	44	25	29	27	23	19	26	22	21	30	25	26	22	22	33
HAHO	44	26	31	27	24	23	28	24	23	30	28	29	27	30	30

HAHU	-	Hamoglobin alpha-Kette	Human (Homo sapiens, L., 1758)
HAHO	-	Hamoglobin alpha-Kette	Pferd (Equus przewalskii caballus, L., 1758)
HAQC	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Kondor (Vultur gryphus, L., 1758, Cathartiformes)
HANA	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Steinadler (Aquila chrysaetos (L., 1758), Accipitriformes)
HAOS	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Nandu (Rhea americana (L., 1758), Struthioformes)
HAHS	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Strauß (Struthio camelus, L., 1758, Struthioformes)
HACH2	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Hockerschwan (Cygnus olor (Gmel., 1769), Anatiformes)
HASTG	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Graugans (Anser anser (L., 1758), Anatiformes)
HAKG	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Huhn (Gallus gallus (L., 1758), Phasianiformes)
HAPA	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Streifengans (Eulabeia indica (Lath., 1790), Anatiformes)
HADK	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Kanadagans (Branta canadensis (L., 1758), Anatiformes)
HASR	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Fasan (Phasianus colchicus colchicus, Phasianiformes)
HASFG	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Stockente (Anas platyrhynchos, L., 1758, Passeriformes)
HAFL	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Spaltfußgans (Anseranas semipalmata (Lath., 1790), Anatiformes)
HAWs	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Flamingo (Phoenicopterus ruber ruber, L., 1758, Phoenicopteroformes)
	-	Hamoglobin alpha-A-Kette	Weißstorch (Ciconia ciconia (L., 1758), Ciconiiformes)

Der Vergleich in den Tabellen X, XI, XII wurde mit dem Alignment Score Programm Version 5 von Orcutt, B.C., Dayhoff, M.O. und Baker, W.C. (1982) Document Date durchgeführt. Die Zahlen oberhalb der Diagonalen entsprechen den Nukleotidaustauschen und die unterhalb den Aminosäureaustauschen.

Tabelle XI
 Vergleichende von alpha^D-, alpha^A- u. pi-Ketten der Hämoglobine
 der Vögel und der alpha-Ketten des Menschen und des Pferdes:

	HAHU	HAHO	HADKO	HADQC	HADOS	HADME	HACH1	HADNA	HADFA	HADSR	HAPME	HACHPE	HAKG	HAKO
HAHU	22	63		68	73	72	71	73	70	70	73	79	52	57
HAHO	17			71	76	74	72	72	72	73	71	78	46	55
HADKO	55	55		21	23	25	26	32	27	35	81	85	72	72
HADQC	55	54			29	33	26	33	25	40	81	84	76	70
HADOS	58	57		23		24	26	23	27	44	80	83	75	74
HACHME	58	57		27	22		28	29	30	37	83	86	72	77
HACH1	57	56		21	21	23		32	8	39	78	80	81	79
HADNA	58	55		25	18	24	23		35	48	73	80	77	75
HADFA	57	56		21	23	25	7	26		39	81	83	79	77
HADSP	59	59		31	35	31	33	37	33		85	87	78	84
HAPME	57	57		59	59	61	56	54	59	63		17	71	76
HACHPE	60	60		60	61	63	57	57	61	65	14		80	82
HAKG	46	46		60	58	58	63	61	60	62	56	61		18
HAKO	41	38		55	55	61	61	59	61	64	60	62	18	

HAHU	-	Hämoglobin alpha-Kette	Human (Homo sapiens, L., 1758)
HAHO	-	Hämoglobin alpha-Kette	Pferd (Equus przewalskii caballus, L., 1758)
HADKO	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Kondor (Vultur gryphus, L., 1758, Cathartiformes)
HADQC	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Steinadler (Aquila chrysaetos (L., 1758), Accipitriformes)
HADOS	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Strauß (Struthio camelus, L., 1758, Struthioformes)
HACHME	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Moschus (Carina moschata (L., 1758), Anatiformes)
HACH1	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Huhn (Gallus gallus (L., 1758), Phasianiformes)
HADNA	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Handu (Rhea americana (L., 1758), Struthioformes)
HADFA	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Fasan (Phasianus colchicus colchicus, Phasianiformes)
HADSR	-	Hämoglobin alpha-D-Kette	Star (Sturnus vulgaris, L., 1758, Passeriformes)
HAPME	-	Hämoglobin alpha-pi-Kette	Moschus (Carina moschata (L., 1758), Anatiformes)
HACHPE	-	Hämoglobin alpha-pi-Kette	Huhn (Gallus gallus (L., 1758), Phasianiformes)
HAKO	-	Hämoglobin alpha-A-Kette	Kondor (Vultur gryphus, L., 1758, Cathartiformes)
HAKG	-	Hämoglobin alpha-A-Kette	Kenadagans (Branta canadensis (L., 1758), Anatiformes)

4. Die Hühnerhämoglobine

Die untersuchten Hühnerhämoglobine (Leghorn A, Rhodeländer, Sonnerathuhn) unterscheiden sich nicht in ihrer Komponentenanzusammensetzung (Anzahl und Mengenverhältnis). Die Summenformeln der tryptischen Peptide Tp 2b/3, 4, 5, 6, 9 der alpha^D-Ketten (Rhodeländer) sind mit den aus der DNA-Sequenz von Leghorn A ermittelten identisch. Eine Mutation im Globingenom seit der Auftrennung der Hühner ist sehr unwahrscheinlich, da nach der Statistik nur alle 8 - 10 Millionen Jahre eine Aminosäure ausgetauscht wird⁽³⁰⁾. Schon Untersuchungen an den Hämoglobinen der Gänse (Anatiformes) haben ergeben, daß innerhalb einer Gattung der Vögel keine Unterschiede auftreten. Erst zwischen den Gattungen lassen sich Austausche feststellen.

Außerdem sind im Genpool der Hühner alle Merkmale (Silberfaktor, Sprenkelzeichnung, schwarze Pigmentierung und Farbausbildung) der vier mutmaßlichen Stammhühner (*Gallus gallus*, *G. sonneratii*, *G. lafayettii* und *G. varius*) enthalten. Dies spricht dafür, daß sich durch topographische Isolierung bestimmter Populationen allenfalls Unterarten herausgebildet haben. Eine polyphylogenetische Abstammung des domestizierten Huhns wird zuweilen postuliert⁽¹³⁷⁾, ist aber nicht gesichert^(138,139,140). Um unterhalb der Gattung molekulare Verwandtschaften festzustellen, ist es nötig, auf Proteine mit höherer Mutationsrate zurückzugreifen, wie beispielsweise auf Fibrinpeptide. In ihnen setzt sich durchschnittlich

alle 1 - 2 Millionen Jahre eine Mutation durch. Die Abstammung der domestizierten Hühnerrassen konnte bisher noch nicht definitiv geklärt werden⁽¹⁴¹⁾. Zu den Rhodeländern ist noch anzumerken, daß sie erst Mitte des 19. Jahrhunderts in den USA durch Einkreuzung von Cochinhühnern in Italiener entstanden. Von diesen Italienern stammen auch die Leghorn A ab. Eine Differenz in den Hämoglobinen beider Rassen ist also auch kaum zu erwarten.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Hämoglobine folgender adulter Vögel untersucht:

Andenkondor (*Vultur gryphus*, L., 1758, Cathartiformes)

Leghorn A-Huhn (*Gallus gallus*, L., 1758, Phasianiformes)

Rhodeländer-Huhn (*Gallus gallus*, L., 1758, Phasianiformes)

Sonnerathuhn (*Gallus gallus*, Temminck, 1758, Phasianiformes).

Im Hämoglobin dieser Tiere wurden mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese 2 Komponenten nachgewiesen:

Hauptkomponente HbA und Nebenkompente HbD.

Durch Chromatographie des Globins an CM-Cellulose konnte gezeigt werden, daß sich die beiden Komponenten nur in ihren alpha-Ketten unterscheiden. Die beta-Ketten sind identisch. Die durch tryptische und hydrolytische Spaltung gewonnenen Peptide wurden durch Gelfiltration, HPLC und DC-Elektrophorese getrennt und durch Aminosäureanalyse identifiziert. Die Sequenzierung erfolgte durch automatischen Edmanabbau im Flüssigphasensystem, die Zuordnung der Peptide durch homologen Vergleich mit den Ketten von Graugans (*Anser anser*) und Fasan (*Phasianus colchicus colchicus*). Veränderungen in den funktionellen Positionen des Kondorhämoglobins im Vergleich zu den bisher bekannten Vogelhämoglobinen werden diskutiert. Die Mutationsrate ist bei Vögeln niedriger als bei Säugern und bei den einzelnen Kettentypen unterschiedlich. Ein Vergleich aller Vogelhämoglobine ergab eine phylogenetisch en-

gere Beziehung von Andenkondor' (*Vultur gryphus*) zu Steinadler (*Aquila chrysaetos*) als zu Weißstorch (*Ciconia ciconia*).

Die Hämoglobine der Hühner zeigten in Elektrophoresen und Kettentrennung keine Unterschiede. Die Summenformeln einiger Peptide der α^D -Ketten des Rhodeländer-Huhns waren mit der entsprechenden DNA-Sequenz des Leghorn A identisch. Eine Mutation scheint innerhalb dieser Hühnerhämoglobine nicht stattgefunden zu haben. Ihre phylogenetische Trennung liegt wahrscheinlich noch nicht lange genug zurück.

The primary structure of the hemoglobins
from adult condor (*Vultur gryphus*)

New aspects on the relationship of the Cathartiformes
(new world vultures) to the Accipitriformes (hawks)
and Ciconiiformes (storks)

Summary

In this work, the examination of the hemoglobins from the following adult birds is presented:

Andean Condor (*Vultur gryphus*, L., 1758, Cathartiformes)

Leghorn A (*Gallus gallus*, L., 1758, Phasianiformes)

Rhode Island Reds (*Gallus gallus*, L., 1758, Phasianiformes)

Grey Jungle Fowl (*Gallus gallus*, Temminck, 1758, Phasianiformes).

Two components could be detected in the hemoglobins of these animals with polyacrylamide gel electrophoresis; a major component HbA and a minor component HbD.

Chromatography of the globin on CM-cellulose showed that the two components differ only in their alpha-chains, the beta-chains being identical. Peptides obtained by tryptical and hydrolytical cleavage were separated by gel filtration, HPLC and thin-layer electrophoresis; identification of peptides was achieved by means of amino acid analysis. The sequence was determined by automated Edman degradation in a liquid phase system and the alignment of the peptides was done by homologous comparison with the chains of *Anser anser* and *Phasianus colchicus colchicus*.

Changes in the functional positions of the condor in comparison with the so far known bird hemoglobins, are discussed. In birds the mutation rate is lower than in mammals and different for each chain type. A comparison of all bird hemoglobins revealed a phylogenetically closer relationship of Andean Condor (*Vultur gryphus*) to Golden Eagle (*Aquila chrysaetos*) than to White Stork (*Ciconia ciconia*). Chicken hemoglobins do not show any differences on electrophoresis. The empirical formulas of some α^D -chain peptides from Rhode Island Red chicken were identical to the corresponding DNA sequence of Leghorn A. Probably, no mutation has occurred within these hemoglobins. It seems that their polyphylogenetical separation took place not too long ago.

La estructura primaria de las hemoglobinas
del cóndor adulto (*Vultur gryphus*).
Aspectos nuevos de las relaciones filogenéticas
de los Cathartiformes
con Accipitriformes y Ciconiiformes.

Resumen:

En el trabajo presentado se caracterizaron las hemoglobinas de las siguientes especies aviares adultas: Cóndor (*Vultur gryphus*, L., 1758, Cathartiformes), Gallina Leghorn A (*Gallus gallus domesticus*, (L., 1758), Phasianiformes), Gallina Rhodeisland Red (*Gallus gallus domesticus*, (L., 1758), Phasianiformes), Gallina de Sonnerat (*Gallus sonneratii*, Temm., 1831, Phasianiformes).

En la hemoglobina de estas especies se encontraron dos compuestos usando electroforesis en gelosa de poliacrilamido: compuesto principal HbA y compuesto secundario HbD. Por medio de cromatografía en CM-celulosa se demostró, que los dos compuestos se distinguen solamente en sus α -cadenas. Las β -cadenas son idénticas. Los péptidos preparados por fisión triptica y hidrolisis se separaron por filtración en gelosa, cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y electroforesis vertical identificandolas por análisis de sus aminoácidos. La determinación de sus secuencias se realizó por reducción automática según EDMAN en fase líquida coordinando los péptidos por comparación homóloga con las cadenas de ganso (*Anser anser*) y de faisán (*Phasianus colchicus colchicus*). Se discuten las alteraciones de las posiciones funcionales

de la hemoglobina del cóndor en comparación con las hemoglobinas aviáres ya conocidas. Mutaciones en especies aviáres son menos frecuentes que en mamíferos y diferentes en los distintos tipos de las cadenas. Comparando las hemoglobinas aviáres conocidas se nota una relación polifilogenéticamente más estrecha entre cóndor (*Vultur gryphus*) y águila (*Aquila chrysaëtos*) que con cigüeña (*Ciconia ciconia*). Las hemoglobinas de las gallinas mostraron ninguna diferencia electroforéticamente y por separación de las cadenas. Las formulas sumarias de algunos de las α^D -cadenas de la gallina Rhodeislands Red correspondieron completamente con las de gallina Leghorn A. Aparentemente no hubo ninguna mutación de las hemoglobinas gallináceas. Probablemente su segregación filogenética no data de un lapso de tiempo muy largo.

- 1 Oberthür, W., Braunitzer, G. und Würdinger, I. (1982)
Das Hämoglobin der Streifengans (*Anser indicus*)
Primärstruktur und Physiologie der Atmung,
Systematik und Evolution.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 581-590
- 2 Braunitzer, G. und Oberthür, W. (1982)
High altitude respiration of the Bar-headed Goose
(*Anser indicus*) and the different evolution of
the alpha and beta-chains in avian hemoglobins.
Chemistry of Peptides and Proteins, 1, 71 - 82
Walter de Gruyter und Co., Berlin, New York
- 3 Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A. und Wiesner, H.
(1980)
Höhenatmung, Phosphat-Protein-Wechselwirkung: Die
Sequenz der Hämoglobine des Goldhamsters (*Meso-
cricetus auratus*) und des zweihöckerigen Kamels
(Trampeltier, *Camelus ferus*, Camelidae).
J. Chem. Soc. Pak. 2, 1 - 7
- 4 Godovac-Zimmermann, J. und Braunitzer, G. (1984)
Hemoglobin of the Adult White Stork (*Ciconia
ciconia*). The primary structure of alpha and beta-
chains from the only present hemoglobin component.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1107 - 1113
- 5 König, C. (1983)
Auf Darwins Spuren. Ökologische Betrachtungen im
Lande des Kondors.
Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin
- 6 Hoppe-Seyler, F. (1864)
Über die chemischen und optischen Eigenschaften
des Blutfarbstoffs.
Virchow's Arch. Pathol. Anat. 29, 233
- 7 Bert, P. (1878)
La pression barometrique.
Masson, Paris
- 8 Hasselbalch, O. (1917)
Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes
aus freier und gebundener Kohlensäure desselben
und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion
der Wasserstoffzahl.
Biochem. Zschr. 78, 122 - 144

- 9 Wastl, H. und Leiner, G. (1931)
 Beobachtungen über Blutgase bei Vögeln.
 1. und 2. Mitteilung.
 Pflügers Arch. Physiologie 227, 367 - 459

- 10 Teichmann, N.L. (1853)
 Über die Crystallisation der organischen Bestand-
 theile des Blutes.
 Z. Ration. Med. (N.S.) 3, 374

- 11 Küster, W. (1912)
 Beiträge zur Kenntniss des Bilirubins und Hämins.
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 82, 463

- 12 Fischer, H. und Zeile, K. (1929)
 Synthese des Hämatoporphyrins, Protoporphyrins
 und Hämins.
 Justus Liebig's Annalen der Chemie 98, 468

- 13 Braunitzer, G., Gehring-Müller, R., Hilschmann, N.,
 Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. und
 Wittmann-Liebold, B. (1961)
 Die Konstitution des normalen adulten Human-
 Hämoglobins.
 Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 325, 283

- 14 Braunitzer, G., Hilschmann, N., Rudloff, V., Hilse,
 K., Liebold, B. und Müller, R. (1961)
 The haemoglobin particles (chemical and genetic
 aspects of their stucture).
 Nature (London) 190, 480

- 15 Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead,
 H., Will, G. und Worth, A.C.T. (1960)
 Structure of haemoglobin.
 Nature (London) 185, 416

- 16 Bunn, H.F., Forget, B.G. und Ranney, H.M. (1977)
 Sickle cell anemia and related disorders
 in Human Haemoglobins, 228 - 281.
 W.B.Saunders Company Philadelphia, London, Toronto

- 17 Herrmann, F.H. und Herrmann, M.C. (1980)
 Das Hämoglobin des Menschen.
 Vieweg Verlag, Braunschweig, Wiesbaden

- 18 Ladner, R.E., Heidner, E.J und Perutz, M.F. (1977)
The structure of horse methaemoglobin at 2.0 Å resolution.
J. Mol.Biol. 114, 385 - 414
- 19 Perutz, M.F. (1979)
Struktur des Hämoglobins und Transportvorgänge bei der Atmung.
Spektrum der Wissenschaften 2, 18 - 34
- 20 Baumann, F.H. und Baumann, R. (1977)
A comparative study of the respiratory properties of bird blood.
Respiration Physiology 31, 333 - 343
- 21 Perutz, M.F. (1983)
Species adaption in a protein molecule.
Mol. Biol. Evol. 1, 1-28
- 22 Misson, B.H.und Freeman, B.M. (1972)
Organic phosphates and oxygen affinity of chick blood before and after hatchling.
Respiration Physiology 14, 343 - 352.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam
- 23 Petschow, D., Würdinger, I., Baumann, R., Duhn, J., Braunitzer, G. und Bauer, C. (1977)
Causes of high blood O₂ affinity of animals living at high altitude.
J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 42, 139 - 143
- 24 Rollema, H.S. und Bauer, C. (1979)
The interaction of inositol pentaphosphate with the hemoglobins of highland and lowland geese.
The Journal of Biological Chemistry 254, 12038 - 12043
- 25 Bartlett, G. R. (1982)
Isolation and assay of red-cell inositol polyphosphates.
Analytical Biochemistry 124, 425 - 431
- 26 Isaaks, R.E., Harkness, D.R., Goldman, P.H., Adler, J.I. und Kim, C.J. (1977)
Studies on avian erythrocyte metabolism VII. Effect of inositol pentaphosphate and other organic phosphats on oxygen affinity of the embryonic and adult-type hemoglobin of the turkey embryo.
Hemoglobin 1, 577 - 593

- 27 Grant, R.B. und Borgese, T.A. (1974)
Phosphate compounds in red cells of the chicken
and duck embryo and hatchling.
Comp. Biochem. Physiol. 55A, 207 - 210
Pergamon Press, Great Britain

- 28 Braunitzer, G. (1967)
Molekularbiologie und Evolution.
Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften E.V. 76 - 101

- 29 Dickerson, R.E. and Geis, I. (1983)
Hemoglobin: structure, function, evolution and
pathology. The Benjamin/Cummings Publishing
Company, Menlo Park, California.

- 30 Kaudewitz, F. (1983)
Genetik.
Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
Unitaschenbücher 1015

- 31 Knippers, R. (1982)
Molekulare Genetik.
Thieme Verlag Stuttgart

- 32 Oberthür, W., Braunitzer, G. und Kalas, S. (1981)
Untersuchungen am Hämoglobin der Graugans
(Anser Anser).
Die Primärstruktur der alpha- und beta- Ketten
der Hauptkomponente.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 362, 1101-1112

- 33 Oberthür, W., Braunitzer, G., Grimm, F. und Kösters, J.
(1983)
Hämoglobine des Steinadlers (Aquila chrysaetos,
Accipitriformes): Die Aminosäuresequenz der
alpha- und beta-Ketten der Hauptkomponente.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 851-858

- 34 Dayhoff, M.O. (1972)
Atlas of protein sequence and structure.
Washington, National Biochemical Research
Foundation
Supplement 1: 1973
Supplement 2: 1976
Supplement 3: 1979

- 35 Wrightstone, R.N. (1984)
List of Haemoglobin variants.
International Haemoglobin Information Center
Haemoglobin 8, 241 - 300
- 36 Zuckerkandl, E., Pauling, L. (1962):
Horizonts in Biochemistry, 182.
Acad. Press, New York,
- 37 Oberthür, W., Godovac-Zimmerman, J. and Braunitzer, G
(1983)
The different evolution of bird haemoglobin
chains. Brussels Hemoglobin Symposium, Editors:
Schnek, A.G und Paul, C.
- 38 Shoshani, J., Goodman, M., Czelusniak, J. and
Braunitzer, G. (1984)
Phylogeny of Rhodentia and other eutherian
orders: Parsimony analysis utilizing amino acid
sequences of alpha and beta hemoglobin chains.
Nato Rhodent Phylogeny Symposium, Preliminary
Manuscript 1 - 24 Pers. Mitteilung
- 39 Mainwaring, W.I.P., Parisch, J.H., Pickering, J.D.
and Mann, N.H.
Nucleic Acid Biochemistry and Molecular Biology
1. Nucleic Acid.
Blackwell Scientific Publications
Oxford, London, Edinburgh, Boston, Carlton.
- 40 Lauer, J., Shen, C.K.J., Maniatis, T. (1980)
The chromosomal arrangement of human alpha-like
globin genes: Sequence homology and alpha-globin
gene deletions.
Cell 20, 119 - 130
- 41 Fritsch, E.F., Lawn, R.M. und Maniatis, T. (1980)
Molecular cloning and characterization of the
human beta-like globin gene cluster.
Cell 19, 959 - 972
- 42 Dodgson, J.B., McCune, K.L., Rushing, D.J., Knist, A.
und Engels, J.D. (1981)
Adult Chicken alpha-globin genes, alpha^A and
alpha^D. No anemic shock alpha-globin exists in
domestic Chickens.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 5998 - 6002

- 43 Dolan, M., Dodgson, J.B. und Engel, J.D. (1983)
Analysis of the adult chicken beta-globin gene.
The Journal of Biological Chemistry 258, 3983 -
2990

- 44 O'Brien, S.J. (1984)
Genetic Maps 1984.
Vol. 3
Cold Spring Harbour, New York

- 45 Hughes, S.H., Stubblefield, E., Payar, F., Engel,
J.D., Dodgson, J.B., Spector, D., Cordell, B.,
Schimke, R.T. und Varmus, H.E. (1979)
Gene localization by chromosome fraction: Globin
genes are on at least two chromosomes and three
estrogen-inducible genes are on three chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1348 - 1352

- 46 Serfling, E. (1982)
Struktur und Expression der Gene höherer
Organismen.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena

- 47 Engels, J.D., Rusling, D.J., Mc Cune, K.C. und
Dodgson, J.B. (1983)
Unusual structure of the Chicken embryonic
alpha-globin gene, pi.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1392 - 1396

- 48 Edman, P. (1950)
Preparation of phenylthiohydantoins from some
natural acids.
Acta. Chem. Scand. 4, 277 - 282

- 49 Braunitzer, G., Schrank B., Stangl A. und
Scheithauer, U. (1978)
(Hämoglobine, XXI)
Die Sequenzanalyse des Hämoglobins des Schweines.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 137 - 146

- 50 Pfletschinger, J. und Braunitzer, G. (1980)
Kovalente, C-terminale Hydrophilisierung von
Bromcyanpeptiden mit Arginin im Sequenator.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 925 - 931

- 51 Pisano, J.J., Bronzert, T.J., Brewer, H.B. (1972)
 Advances in the gas chromatographic analysis of
 amino acid phenyl- and methylthiohydantoins.
 Anal. Biochem. 45, 43 - 59

- 52 Zimmermann, C.L. und Pisano, J.J. (1977)
 High-performance liquid chromatography of amino
 acid derivatives.
 Methods Enzymol. 47, 45 - 51

- 53 Braunitzer, G. (1960)
 Vollautomatische , quantitative Aminosäure-
 Bestimmung.
 Angewandte Chem. 72, 485 - 489

- 54 Bieber, F.A. und Braunitzer, G. (1984)
 Zur prä- und perinatalen Sauerstoffübertragung
 der Säuger. Die embryonalen Hämoglobine vom
 Hausschwein (*Sus scrofa domestica*).
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 321 - 334

- 55 Pauly, H. (1915)
 Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweisses.
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 94, 284 - 290

- 56 Frank, H. und Petersen, H. (1955)
 Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von
 Histidin in der Papierchromatographie.
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 299, 1

- 57 Dagliesh, C.E. (1952)
 The relation between pyridoxin and tryptophan
 metabolism, studied in the rat.
 Biochem. J. 52, 3

- 58 Gottlieb, A.J. und Itano, H.A. (1963)
 Blocking of tryptic cleavage of arginyl bonds
 by the chemical modification of the guanid
 group with benzil.
 J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 405

- 59 Winnegard, H.M., Toennies, G. und Block, R.J. (1948)
 Detection of sulfur-containing amino acids
 on paper chromatograms.
 Science 108, 506

- 60 Edman, P. (1950)
 Method for determination of the amino acid
 sequence in peptides.
 Acta Chemica Scandinavica 4, 283 - 293

- 61 Edman, P. und Begg, G. (1967)
A protein sequenator.
Eur. J. Biochem. 1, 80 - 91

- 62 Braunitzer, G., Schrank, B., Ruhfus, A., Petersen, S.
und Petersen, U. (1971)
Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse
von Peptiden mit Quadrol.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730 - 1732

- 63 Braunitzer, G und Schrank, B. (1970)
3-Dimethylamino-1-propin als Puffersubstanz.
Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 351, 417

- 64 Braunitzer, G., Schrank, B., Petersen, S. und
Petersen, U. (1973)
Über epsilon-Markierung von Peptiden.
Automatische Sequenzanalyse des Insulins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1563 - 1566

- 65 Hewick, R.M., Hunkapillar, M.W., Hood, L.E. und
Deyer, W.J. (1981)
A gas-liquid solid phase peptide- and protein-
sequenator.
J. Biol. Chem. 256, 7990 - 7997

- 66 Strickler, J.E., Hunkapillar, M.W. und Kenneth, J.W.
(1984)
Utility of the gasphase sequencer for both
liquid- and solid phase degradation of proteins
and peptides at low picomole levels.
Anal. Biochem. 140, 553 - 566

- 67 Laursen, R.A. (1971)
Solidphase Edman-degradation.
An automatic peptid sequencer.
Eur. J. Biochem. 20, 89

- 68 Needleman, S.B., Laursen, R.A. und Horn, M.J. (1977)
Coupling methods and strategies in solid-phase
sequencing.
Molecular Biology Biochemistry and Biophysics
25, 21 - 37

- 69 L'Italien, J.J. und Strickler, J.E. (1982)
Application of high-performance liquid chromatographic peptide purification to protein microsequencing by solid-phase Edman-degradation.
Anal. Biochem. 127, 198 - 212
- 70 Braunitzer, G. (1985), pers. Mitteilung
- 71 Kratzin, H., Yang, C., Krusche, J.U. und Hilschmann, N. (1980)
Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysates eines Proteins mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1591 - 1598
- 72 Dixon, H.B.F. und Perham, R.N. (1968)
Reversible blocking of amino groups with citraconic acid.
Biochem. J. 109, 312 - 314
- 73 Hill, R.L. und Königsberg, W. (1962)
The structure of human hemoglobin IV.
The chymotryptic digestion of the alpha-chain of human hemoglobin.
J. of Biol. Chem. 237, 3151
- 74 Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Cormick, J. und Jones, R.T. (1963)
The amino acid sequence of the gamma-chain of human fetal hemoglobin.
Biochemistry (USA) 2, 992 - 1008
- 75 Königsberg, W., Goldstein, J. und Hill, R.J. (1963)
The structure of human hemoglobin VII.
The digestion of the beta-chain of human hemoglobin with pepsin.
J. Biol. Chem. 238, 2028
- 76 Königsberg, W. und Hill, R.J. (1962)
The structure of human hemoglobin V.
The digestion of the alpha-chain of human hemoglobin with pepsin.
J. Biol. Chem. 237, 3157
- 77 Houmard, J. und Drapeau, G.R. (1972)
Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 3506

- 78 Burstein, Y., Walsh, K.A. und Neurath, H. (1974)
Evidence of an essential histidin residue in
thermolysin.
Biochemistry (USA) 13, 205 - 210
- 79 Sengbusch, P.V. (1979)
Molekular und Zellbiologie.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
1.Aufl., 130 - 134
- 80 Gross, E. und Wittkop, B. (1961)
Selective cleavage of the methionyl peptide bonds
in ribonuclease with cyanogen bromide.
J. Am. Chem. Soc. 83, 1510 - 1511
- 81 Jauregui-Adell, J. und Marti, J. (1975)
Acidic cleavage of the aspartyl proline bond and
the limitations of the reaction.
Anal. Biochem. 69, 468 - 473 und 3506
- 82 Cooper, T.G. (1981)
Biochemische Arbeitsmethoden.
Walther de Gruyter, Berlin, New York, 126-156
- 83 Shimizu, K. und Huisman, J.B. (1980)
The determination of the percentages of G-gamma-
and A-gamma-chains in human fetal hemoglobin
by HPLC.
Hemoglobin 4, 487 - 496
- 84 Ponstingl, L.H., Krauhs, C., Little, M., Kempf, T.,
Hofer-Warbinek, R. und Ade, W. (1981)
HPLC in biochemistry, proteins, peptides, amino
acids.
(Lottspeich, F. und Henschen, A.)
Verlag W. de Gruyter, Berlin 325 - 338
- 85 Meyer, Veronika (1979)
Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeits-
chromatographie.
Verlag Diesterweg Salle Sauerländer
- 86 Cannan, R.K. (1958)
Hemoglobin standard.
Science 127, 1376 - 1378

- 87 Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. und Caputo, A. (1958)
Studies on the structure of hemoglobin.
I Physiochemical properties of human globin.
Biochem. Biophys. Acta 30, 608 - 615
- 88 Davis, B.J. (1964)
Disc electrophoresis-II;
Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 - 427
- 89 Maurer, H.R. (1968)
Disk-Elektrophorese.
Walter de Gruyter u. Co., Berlin
- 90 Strauch, L. (1967)
Eine Apparatur für die präparative Disk-
Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel.
Proteids of the Biological Fluids 15, 535
- 91 Rovera, G., Magarian, C. und Borun, T.W. (1978)
Resolution of hemoglobin subunits by electro-
phoresis in acid urea polyacrylamide gels
containing Triton X-100.
Anal. Biochem. 85, 506 - 518
- 92 Alter, B.P., Goff, S.C., Efremov, G.D. Gravely, M.E.
und Huisman, T.H.J. (1980)
Globin chain elektrophoresis: a new approach
to the determination of the G-gamma/A-gamma
ratio in fetal haemoglobin and to studies of
globin synthesis.
Br. J. Haematol. 44, 527 - 534
- 93 Hirs, C.H.W. (1956)
The oxidation of ribonuclease with performic
acid.
J. Biol. Chem. 219, 611 - 621
- 94 Matsubara, H. und Sasaki, R.M. (1969)
High recovery of tryptophan from acid
hydrolysates of proteins.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 175 - 181
- 95 Spackman, D.H., Stein, W.H. und Moore, S. (1958)
Automatic recording apparatus for use in the
chromatography of amino acids.
Anal. Chem. 30, 1190 - 1206

- 96 Wolters, H.E. (1975 - 1982)
Die Vogelarten der Erde.
Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin
- 97 McGahan, J. (1973)
Flapping flight of the andean condor in nature.
J. Exp. Biol. 58, 239 - 253
- 98 Pennycuik, C.J. und Scholey, K.D. (1984)
Flight behavior of andean condors *Vultur gryphus*
and the turkey vultures *Cathartes aura* around
the Paracas Peninsula, Peru.
Ibis 126, 253 - 256
- 99 Brown, L. (1979)
Die Greifvögel: Ihre Biologie und Ökologie.
Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- 100 De Smet, H.O. (1978)
A comparison of the electrophoretic haemoglobin
pattern of the vertebrates.
Acta Zool. et Pathol. Antrepiensia, 70, 119 - 131
- 101 Godovac-Zimmermann, J. und Braunitzer, G. (1984)
The amino acid sequence of alpha- and
beta-chains from the major hemoglobin component
of American Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 437 - 443
- 102 Oberthür, W., Wiesner, H. und Braunitzer, G. (1983)
Die Primärstruktur der alpha- und beta-Ketten der
Hauptkomponente der Hämoglobine der Spaltfußgans
(*Anseranas semipalmata*, Anatidae).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 51 - 59
- 103 Braunitzer, G. und Godovac, J. (1982)
The amino acid sequence of Pheasant (*Phasianus
colchicus colchicus*) hemoglobins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 229 - 238
- 104 Godovac-Zimmermann, J. und Braunitzer, G. (1983)
The amino acid sequence of Northern Mallard
(*Anas platyrhynchos*) hemoglobin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 665 - 674

- 105 Oberthür, W., Godovac-Zimmermann, J. und Braunitzer, G. (1984)
The amino acid sequence of Canada Goose (*Branta canadensis*) and Mute Swan (*Cygnus olor*) hemoglobins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 777 - 787
- 106 Godovac-Zimmerman, J. (1985)
Persönliche Mitteilung.
- 107 Faraci, F.M., Kilgore, D.L. und Fedde, M.R. (1984)
Oxygen delivery to the heart and brain during hypoxia: Peking duck vs. Bar-headed goose.
Am. J. Physiol. 247, (Regulatory Interactive Comp. Physiol. 16) R69 - R75
- 108 Arnone, A. und Perutz, M.F. (1974)
Structure of inositol hexaphosphate-human deoxyhaemoglobin complex.
Nature 249, 34 - 36
- 109 Oberthür, W., Braunitzer, G., Baumann, R. und Wright, P.G. (1983)
Die Primärstruktur der alpha- und beta-Ketten der Hauptkomponenten der Hämoglobine des Straußes (*Struthio camelus*) und des Nandus (*Rhea americana*) (*Struthioformes*).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 119 - 134
- 110 Oberthür, W. und Braunitzer, G. (1984)
Hämoglobine vom Gemeinen Star (*Sturnus vulgaris*, *Passeriformes*). Die Primärstruktur der alpha- und beta-Ketten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 159 - 173
- 111 Bland, D.K. und Holland, R.A.B. (1977)
Oxygen affinity and 2,3-diphosphoglycerate in blood of Australian Marsupials of differing body size.
Respiration Physiology 31, 279 - 290
- 112 Chapman, B.S., Tobin, A.J. und Hood, L.E. (1981)
Complete amino acid sequence of the major early embryonic beta-like globin in chickens.
J. Biol. Chem. 256, 5524 - 5531
- 113 Fermi, G. und Perutz, M.F. (1981)
Atlas of Molecular Structures in Biology: Hemoglobin and Myoglobin.
Clarendon Press, Oxford

- 114 Dahms, T., Horvarth, S.M., Luzanna, M., Rossi-Bernardi, L., Roughton, F.J.W. und Stella, G. (1972)
The regulation of oxygen affinity of human hemoglobin.
J. Physiol. 223, 29P -31P
- 115 Isaacks, R.E., Harkness, D.R., Adler, J.L und Goldman, P.H. (1976)
Studies on avian erythrocyte metabolism.
Arch. Biochem. Biophys. 173, 114 - 120
- 116 König, C. (1982)
Zur systematischen Stellung der Neuweltgeier (Cathartidae).
J. Orn. 123, 259 - 267
- 117 Jacob, J. (1983)
Zur systematischen Stellung von Vultur gryphus (Cathartiformes).
J.Orn., 124, 83 - 86
- 118 Shibley, C.G. und Ahlquist, J.E. (1972)
A comparative study of the egg-white proteins of non-passerine Bird.
Bull. Peabody Mus. Nat. Hist. 39 (Yale Univ.)
- 119 Goodchild, J.G. (1891)
The cubital coverts of the Euornithae in relation to taxonomy.
Roy. Phys. Soc. Edinburg, Proc. 11, 317 - 333
- 120 Goodchild, J.G. (1886)
Observations on the disposition of the cubital coverts in birds.
Zool. Soc. London, Proc. 1886, 184 - 203
- 121 Pycraft, W.P. (1902)
Contributions to the osteology of birds. Part V. Falconiformes.
Zool. Soc. London, Proc. 1902, 277 - 320
- 122 Chandler, A.C. (1916)
A study of the structure of feathers with the reference of their taxonomic value.
Univ. Calif. Publ. Zool. 13, 243 - 446

- 123 Compton, L.V. (1938)
The pterylosis of the Falconiformes with
special attention to the taxonomy of the
osprey.
Univ. Calif. Publ. Zool., 42, 173 - 212
- 124 Hudson, G.E. (1948)
Studies on the muscles of the pelvic appendage
in birds.
II. The heterogeneous order Falconiformes
Amer. Midl. Nat. 39, 102 - 127
- 125 Fisher, H.I. (1939)
Adaptation and comparative anatomy of the
locomotor apparatus of the new world vultures.
Amer. Midl. Nat., 35, 545 - 727
- 126 Howard, H (1950)
Fossil evidence of avian evolution.
Ibis 92, 1 - 21
- 127 Mayer, E. und Amadon, D. (1951)
A classification of recent birds.
Amer. Mus. Novitates, 1496, 1 - 42
- 128 Peakall, D. B. (1963)
Egg-white proteins as an aid to avian
systematics.
Int. Orn. Congr. Proc. (13th, 1962), 135 - 140
- 129 Shibley, C. G. (1960)
The electrophoretic patterns of the avian
egg-white proteins as taxonomic characters.
Ibis 102, 215 - 284
- 130 Ligon, J. D. (1967)
Relationship of the Cathartid vultures.
Univ. Michigan Mus. Zool. Occas. Papers,
651, 1 - 26
- 131 Jollie, M. (1953)
Are the Falconiformes a monophyletic group?
Ibis 95, 369 - 371

- 132 Voipio, P. (1955)
Muuttuva Lintujen Järjestelmä
(Das veränderliche System der Vögel)
(German summary).
Ornis Fennica 32, 108 - 129
- 133 Goodman, M., Braunitzer, G., Stangl, A. und
Schrack, B. (1983)
Evidence on human origins from haemoglobins of
African apes.
Nature 303, (5917), 546 - 548.
- 134 Wilson, B. W. (1980)
Birds.
Scientific American
H.W.H Freeman and Company, San Francisco
- 135 Cracraft, J. und Rich, P.V. (1972)
The systematics and evolution of the
Cathartidae in the old world tertiary.
Condor 74, 272 - 283
- 136 Wilson, A.C., Carlson, S.S. und White, T.J.
Biochemical Evolution.
Ann. Rev. Biochem. 46, 573 - 639
- 137 Hutt, F.B. (1949)
Genetics of the fowls.
Mc Graw-Hill Book Company, London
- 138 Grzimek, B. (1976)
Grzimeks Tierleben; Vögel II; Bd.8
Kindler Verlag Zürich
- 139 Gandert, O. F. (1953)
Zur Abstammungs- und Kulturgeschichte des Haus-
geflügels, insbesondere des Haushuhns.
Beiträge zur Frühgeschichte der
Landwirtschaft 1, 69 - 81
- 140 Herre, W. (1958)
Abstammung und Domestikation der Haustiere.
Handbuch der Tierzucht Bd. 1.
Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin
- 141 Scholtyssek, S. und Doll, P. (1978)
Nutz- und Ziergeflügel.
Ulmer Verlag Stuttgart

Lebenslauf

Hans Wilhelm Bauer

Am 9. August 1958 wurde ich als Sohn, des Landwirts Helmut Bauer und seiner Ehefrau Lina Bauer, geb. Breitschwerd, in Gerabronn, Kreis Schwäbisch Hall/ Baden-Württemberg, geboren.

Vom 30. April 1965 an besuchte ich die Grundschule in Michelbach an der Heide, Kreis Schwäbisch Hall.

Am 1. August 1968 wechselte ich in das Gymnasium Gerabronn über und schloß dieses mit der Reifeprüfung am 24. Mai 1977 ab.

Vom Wintersemester 1977/78 bis zum Bestehen der Tierärztlichen Prüfung im März 1983 studierte ich an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

Vom 1. Juli 1983 bis 1. März 1985 führte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Proteinchemie, unter Leitung von Prof. Dr. G. Braunitzer, die vorliegende Dissertation durch.

Seit 1. März 1985 leiste ich Zivildienst.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer von Juli 83 bis Febr. 85 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer danke ich für die großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Kösters (Leiter des Instituts für Geflügelkrankheiten der tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München) danke ich für die wertvolle Diskussion und wohlwollende Beratung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Kösters und Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer danke ich für die Überlassung des Themas.

Für die Betreuung der Arbeit bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. W. Oberthür.

Für weitere Anregungen danke ich Frau Dr. J. Godovac-Zimmermann.

Bei Herrn Schmidt, Falknerei in Bad Wörishofen, bedanke ich mich für die Bereitstellung der Andenkondore und Herrn Dr. F. Grimm (Institut für Geflügelkrankheiten) danke ich für die Gewinnung des Blutes.

Frau Dr. T. Kleinschmidt danke ich für die Durchsicht der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere Herrn A. Stangl und Frl. E. Müller für die Durchführung der Analysen und Frau B. Schrank, Herrn C. Krombach und Frl. R. Gautsch für die ausgezeichnete Arbeit am Sequenator.

